

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

**Львівський національний університет ветеринарної медицини
та біотехнологій імені С. З. Гжицького
Кафедра біотехнології та радіології**

ПРОМИСЛОВА БІОТЕХНОЛОГІЯ
Методичні вказівки для лабораторних робіт
здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти
спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія
ОП «Біотехнології та біоінженерія»



Львів – 2024

Промислова біотехнологія : методичні вказівки для лабораторних робіт здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія ОП «Біотехнології та біоінженерія» / уклад. О. В. Штапенко, Н. П. Кіт. Львів : Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, 2024. 88°с.

Рецензент : Ковальчук І. І. – доктор ветеринарних наук, професор, завідувач кафедри нормальної та патологічної фізіології імені С. В. Стояновського Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького.

Рекомендовано навчально-методичною радою факультету харчових технологій та біотехнології ЛНУВМБ імені С. З. Гжицького.
Протокол № 8 від 24 жовтня 2024 р.

Зміст

Особливості правила техніки безпеки при виконанні лабораторних робіт	
Техніка безпеки при роботі в лабораторії ю.....	5
Тема 1. Джерела контамінації виробництв і харчових інфекцій та отруєнь.....	6
Лабораторна робота №1. Дослідження якості хлібопекарських виробів.	
Лабораторна робота №2. Дослідження модифікації крохмалю.....	9
Лабораторна робота №3. Якісні реакції для виявлення фальсифікації продуктів харчування.....	11
Тема 2. Виробництво молочнокислих продуктів.....	13
Лабораторна робота №1. Аналіз кисломолочних продуктів.....	13
Лабораторна робота №2. Аналіз заквасок йогуртів.....	18
Лабораторна робота №3. Кислотна коагуляція.....	24
Лабораторна робота №4. Аналіз продуктів сироваріння.....	26
Тема 3. Визначення якості хлібопекарських дріжджів.....	27
Лабораторна робота №1. Оцінка мікробної чистоти та придатності дріжджів для виробництва хліба.....	27
Лабораторна робота №2. Аналіз харчових хлібопекарських пресованих (пивних, сухих) дріжджів.....	28
Тема 4. Технологія спирту.....	32
Лабораторна робота №1. Аналіз сировини для біотехнологічних виробництв. Аналіз меляси.....	32
Лабораторна робота № 2. Аналіз культуральної рідини на вміст цукрів (спирт, пиво тощо).....	35
Лабораторна робота № 3. Ферментаційне одержання спирту з меляси.	
Лабораторна робота №4. Одержання спирту із зернового помелу.....	39
Лабораторна робота №5. Визначення масової частки спирту у вині, пиві та інших алкогольних напоях.....	41
Тема 5. Біотехнологічні аспекти пивоваріння.....	42
Лабораторна робота №1. Дослідження культур дріжджів, що використовуються в пивоварінні. Вивчення класичних технологій пивоваріння.....	42
Лабораторна робота № 2. Оцінка якості пива.....	43
Тема 6. Біотехнологія виробництва харчових кислот.....	47
Лабораторна робота № 1. Аналіз лимонної кислоти.....	47
Лабораторна робота № 2. Визначення кількості молочної кислоти методом титрування.....	48
Лабораторна робота № 3. Визначення кількості молочної кислоти методом титрування.....	51
Тема 7. Біотехнологія амінокислот.....	53
Лабораторна робота № 1. Способи отримання L-амінокислот.....	53
Лабораторна робота № 2. Розділення амінокислот за допомогою розподільної хроматографії на папері.....	56
Лабораторна робота № 3. Промислове виробництво амінокислот.....	57

Тема 8. Біотехнологія отримання вітамінів.....	58
Лабораторна робота №1. Якісне та кількісне визначення вітаміну В1	58
Лабораторна робота №2. Якісне та кількісне визначення вітаміну В2.....	61
Лабораторна робота №3. Якісне та кількісне визначення вітаміну С.....	63
Лабораторна робота №4. Виділення каротиноїдів із зелених частин рослин.....	65
Лабораторна робота №5. Якісне визначення вітамінів D та Е.....	65
Тема 9. Біотехнологія ферментів.....	66
Лабораторна робота №1. Аналіз ферментних препаратів: уреазі.....	66
Лабораторна робота № 2. Дослідження тирозинази.....	69
Лабораторна робота № 3. Дослідження сахарази.....	70
Лабораторна робота № 4. Вивчення впливу фізико-хімічних факторів на активність ферментів (на прикладі α -амілаза слини).....	70
Лабораторна робота № 5. Визначення активності каталази.....	72
Лабораторна робота № 6. Визначення активності пероксидази.....	73
Тема 10. Біотехнологічне виробництво гормонів.....	73
Лабораторна робота №1 Якісні реакції на гормони.	73
Тема 11. Промислове отримання антибіотиків.....	75
Лабораторна робота №1. Визначення кількості антибіотиків.....	75
Лабораторна робота №2. Біологічні методи визначення кількості антибіотиків.....	78
Тема 12. Технологічне вирішення біотехнологічних виробництв.....	82
Лабораторна робота №1. Складання технологічних блок-схем з режимами біопроцесів.....	82
Рекомендована література.....	86

ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ ПРИ РОБОТІ У ЛАБОРАТОРІЇ

Перш ніж приступити до практичної роботи, необхідно вивчити наявні в кожній хімічній лабораторії інструкції з техніки безпеки, що розроблені на основі загальних «Правил з техніки безпеки та виробничої санітарії при роботі в хімічній лабораторії». Крім того, необхідно вивчити правила протипожежної безпеки та заходи по наданню першої допомоги при нещасних випадках. Слід ознайомитися з наявними в лабораторії засобами пожежогасіння та знати їх місцезнаходження.

Заходи обережності при роботі в лабораторії.

1. У лабораторії можна працювати тільки в спеціальному одязі (халат, шапочка).
2. На робочому місці підтримувати чистоту і порядок.
3. Всі пляшки, флакони, колби і склянки після відбору реактиву відразу закривати корками і ставити на місце.
4. Щоб зберегти реактиви чистими, рештки невикористаної речовини не можна повертати в реактивні пляшки, флакони, колби і склянки. Реактиви загального користування не можна переносити на свої робочі місця.
5. Концентровані луги і кислоти наливати під витяжною шафою. При розбавленні концентрованих кислот завжди кислоту лити у воду, а не навпаки.
6. Пробувати реактиви на смак, а також їсти і курити в лабораторії забороняється.
7. При роботі з отруйними речовинами (спирти, ефіри, ацетон, бензол, фенол, солі важких металів та ін.) дотримуватись застережних заходів, щоб уникнути попадання їх на шкіру і слизові оболонки.
8. У випадку попадання кислоти чи лугу на руки або обличчя необхідно швидко змити їх водою і нейтралізувати (кислоту – розчином NaHCO_3 ; луг - 2% розчином борної кислоти) і повторно промити водою.
9. Після закінчення роботи злити з пробірок розчини до відповідного посуду і привести робоче місце до порядку.
10. Не можна залишати в лабораторії без догляду включені електричні прилади та газові пальники.

Заходи по наданню першої допомоги при нещасних випадках.

При порізі рук склом потрібно перш за все виїняти пінцетом кусочки його з рани. Потім змазати рану спиртовим розчином йоду (або розчином Люголя), накрити шматочками марлі та вати і накласти пов'язку. При невеликому пораненні після обробки розчином йоду рану можна закрити лейкопластирем чи замазати клеєм БФ-6.

Якщо кровотеча відразу не припиняється, то потрібно накласти шматочок кровоспинної вати. Її можна виготовити в лабораторії, просякнувши гігроскопічну вату 10% розчином хлорида заліза (III) або 3% розчином перексиду водню. При сильній кровотечі, зв'язаній з пораненням більш товстих кров'яних судин, порібно тимчасово перетянути руку еластичним жгутом з гумової трубки.

При термічному опіку потрібно відразу змочити обпечене місце 5% розчином таніну в 40% етиловому спирті. Краще накласти невеликий компрес з вати чи марлі, змоченої цим розчином.

При опіках міцними лугами потрібно промити уражену ділянку водою і накласти компрес з вати, змоченої 1% розчином оцтової кислоти. Якщо кислота або луг потрапили в око, то слід його ретельно промити водою, а потім або 2% розчином гідрокарбонату натрію (для нейтралізації кислоти) або 2% розчином борної кислоти (для нейтралізації лугу). Для промивання очей краще всього користуватися очною ванночкою.

Тема 1 : Джерела контамінації виробництв і харчових інфекцій та отруєнь.

Лабораторна робота № 1.

Тема роботи: Дослідження якості хлібопекарських виробів.

Визначення якості хліба

Хліб - харчовий продукт, що випікається з борошна та води, зазвичай додають дріжджі, кисле тісто або хімічний розпушувач тіста. Якість хліба оцінюють за органолептичними показниками і масою виробів.

Визначають якість хлібної продукції також і за її фізико-хімічними властивостями — вологістю, кислотністю, пористістю, набуханням, вмістом жиру й цукру.

Таблиця 1.

Фізико-хімічні показники	Норми для хліба з пшеничного борошна			Норми для хліба з житнього борошна
	Вищого сорту	Першого сорту	Другого сорту	
Вологість, %	44	45	45	51
Кислотність, °Н	3	3	4	12
Пористість, %	74	70	67	48

При підвищеній вологості м'якушка хліба липка, волога на дотик, нееластична, після легкого надавлювання пальцями не набуває початкової форми, хліб важкий. При пониженому вмісті вологи у виробі м'якушка їх ущільнена.

Найпоширенішим видом фальсифікації хліба є використання низько сортної муки, що маскується посилювачами смаку, барвниками та техніки

розмочування. Для прикладу: хліб із пшеничної муки I або II сорту забарвлений в коричневий колір, видають за житній. Іншим методом фальсифікації є додавання у тісто розмоченого хліба, здійснення так званого – безвідходного виробництва.

Картопляна хвороба хліба - одне з найпоширеніших захворювань хліба, спричиняється спорами картопляної палички, які потрапляють у хліб разом з борошном. Ці спори гинуть тільки при температурі 130°C. Хвороба проявляється після 10 год. зберігання при температурі 30-40°C. Тому хвороба найчастіше проявляється в літній період.

За сприятливих умов спори картопляної палички під час зберігання хліба проростають, а бактеріальні клітини, що утворюються, своїми амілолітичними й протеолітичними ферментами розкладають крохмаль і білки хліба. Крохмаль перетворюється в декстрини, а білки - в амінокислоти, пептони й аміді. Накопичення продуктів розпаду речовин, особливо білків, надає м'якушці різкого, неприємного специфічного запаху і смаку. Хліб, заражений

картопляною хворобою, може накопичувати отруйні речовини, тому в їжу не використовують.

Картопляною хворобою заражається в основному пшеничний хліб, особливо більшої маси. Прискорюють цей процес низька кислотність та підвищена вологість виробів.

Дослід №1. Визначення якості та фальсифікації продуктів хлібопечення. Вологість хліба.

Вологість є важливим показником харчової цінності хліба та інших хлібобулочних виробів, оскільки кожний зайвий відсоток вологи зменшує енергетичну цінність харчових продуктів. Наприклад, енергетична цінність 1 кг хліба при наявності вологості в 1% зменшується на 167-209 кДж. Крім того, при зайвій вологості харчові продукти мають низькі органолептичні властивості, гірше засвоюється, швидше пліснявіють. Вологість різних сортів хліба коливається від 42% до 51 %. Серед різних хлібних виробів вища вологість у житніх сортів хліба, а нижча - у пшеничних з борошна високої якості.

Реактиви та обладнання: сушильна шафа, скляні бюкси з кришками, ваги.

Методика визначення

Для визначення вологості хліба відбирають його м'якушку, подрібнюють, перемішують і вносять 5 г проби у попередньо зважений бюкс із кришкою.

Бюкс із наважкою і відкритою кришкою ставлять у сушильну шафу при температурі 130°C на 40 хв. Зменшення маси відповідає кількості вологи у взятій наважці.

Розрахунки

Вологість у відсотках вираховують за формулою:

$$X = \frac{m_1 - m_2}{m} \cdot 100$$

де m_1 - маса бюкса з наважкою до висушування (г);
 m_2 - маса бюкса з наважкою після висушування (г);
 m - маса наважки хліба (г).

Примітка

Масова частка вологи хліба складає (%): у пшеничного 42-46%, у здобних виробів 37-45%; у хліба з житнього борошна 46-51%; у хліба житньо-пшеничного 45-50%.

Дослід №2. Кислотність хліба.

Кислотність хліба залежить в основному від наявності молочної та оцтової кислот, що утворюються при бродінні тіста. Нормальна кислотність надає йому приємного смаку і сприяє кращому засвоєнню. Хліб з високою кислотністю (перекислий) – не смачний і може бути шкідливим для здоров'я. Кислотність хліба зумовлена продуктами бродіння тіста і виражається в градусах Неймана ($^{\circ}\text{H}$). Під градусом кислотності розуміють об'єм розчину $\text{C}(\text{NaOH})=1$ моль/л, необхідний для нейтралізації кислот, які містяться в 100 г м'якушки.

Реактиви: 0,1 н розчин NaOH , 1% спиртовий розчин фенолфталеїну.

Обладнання: пластикова пляшка з корком – 500 мл, колба конічна місткістю 250, колба із притертим шліфом місткістю 500 мл та пробка, піпетка, циліндр, бюретка.

Методика визначення

М'якуш хліба масою 25 г поміщають у пластикову пляшку (або колбу із добре притертим корком) місткістю 500 мл і порціями при перемішуванні доливають з мірної колби дистильовану воду об'ємом 250 мл кімнатної температури.

Пляшку щільно закривають пробкою, струшують 2 хв і залишають у спокої на 8 хв. Відстояні шари рідини фільтрують через марлю в суху склянку. Потім відбирають піпеткою 50 мл фільтрату конічну колбу місткістю 200-250 мл і титрують 0,1 н розчином NaOH , у присутності 2-3 крапель 1% спиртового розчину фенолфталеїну до одержання слабо рожевого забарвлення, яке не зникає протягом 1 хв.

Розрахунки

Кислотність хліба X ($^{\circ}\text{H}$) обчислюють за формулою,

$$X = \frac{V \cdot 25 \cdot 50 \cdot 4 \cdot 1}{250 \cdot 10}$$

де V -об'єм 0,1 н розчину NaOH , витраченого на титрування, мл;

250- об'єм дистильованої води, взятої на визначення, мл;

50 – кількість витяжки, взятої на титрування, мл;

25 – наважка м'якушки, г;

4 – коефіцієнт, що приводить до 100 г наважки;

1/10 – приведення 0,1 н розчину NaOH до 1 М.

Примітки

Кислотність ($^{\circ}\text{H}$) у хліба із пшеничного сортового борошна 2-7; у житнього 7-12, житньо-пшеничного 7-11, у здобних виробів 2,5-4.

Дослід №3. Пористість хліба.

Під пористістю розуміють відношення об'єму пор м'якушки до загального об'єму хлібної м'якушки, виражене у відсотках. Пористість м'якушки хліба і булочних виробів масою не менше 200 г визначають методом Зав'ялова.

Обладнання: ваги, циліндр металічний.

Методика визначення

Із середини виробу вирізають шматок товщиною 2 см на відстані не менше 1 см від скоринки вирізають м'якушки хліба і роблять виїмки циліндром. Гострий край циліндра змащують рослинною олією. Циліндр вводять обертальним рухом в м'якушку. М'якушку, яка залишилася в циліндрі, виштовхують.

Розрахунки

Об'єм вирізаного циліндра хлібної м'якушки обчислюють за формулою:

$$V = \frac{3,14 \cdot d^2 \cdot H}{4}$$

де d- внутрішній діаметр циліндра, см;

H - висота циліндра хлібної м'якушки, см.

Для визначення пористості пшеничного хліба роблять три циліндричні виїмки, житнього - чотири виїмки.

Приготовані виїмки (три або чотири) зважують усі разом з точністю до 0,01 г. Пористість обчислюють за формулою, %:

$$X = \frac{V - \frac{M}{\rho}}{V} \cdot 100$$

де V-загальний об'єм виїмок хліба, см³;

M- маса усіх виїмок, г;

с – щільність безпористої маси м'якушки.

Примітка

Щільність безпористої маси хліба (г/см) наведена нижче:

-житній, житньо-пшеничний і пшеничний із оббивного борошна- 1,21

-житній заварний і пекльований - 1,27

-пшеничний вищого і I сортів - 1,31

-пшеничний II сорту - 1,26

Пористість житнього хліба повинна складати 45-48%; житньо-пшеничного хліба - 47-50%; пшеничного хліба - 64-72%.

Лабораторна робота №2.

Тема роботи: «Дослідження модифікації крохмалю».

Мета: дослідження впливу концентрації лимонної кислоти та часу обробки на процес модифікації крохмалю.

Завдання: визначення концентрації та часу обробки, що у комплексі надає найвищий ступень полімеризації.

Практичне значення визначається необхідністю створення модифікованого крохмалю вітчизняного виробництва. Завдяки своїм позитивним властивостям його можна використовувати в медичних цілях для створення виробів санітарно-гігієнічного, косметологічного і лікувального призначення. Матеріал на основі модифікованого крохмалю з додаванням природніх полімерів та медичних препаратів будуть мати пролонговану дію, легко піддаватися регулюванню їх еластичних властивостей; з них добре вивільнюється й всмоктуються діючі речовини. Це відкриває перспективи отримання біосумісних плівок та нетканих матеріалів з антисептичними та фунгіцидними властивостями.

Крохмаль – полімер, який займає активні позиції для досліджень його властивостей та пошуку нових сфер застосування. Промислові джерела крохмалю - є кукурудза, пшениця, картопля, тапіока і рис. В даний час, крохмаль є недорогою, доступною та щорічно відновлювальною сировиною, що перевищують поточні потреби ринку в світі.

Також велика група матеріалів одержується шляхом модифікації крохмалю – хімічних, фізичних та фізико-хімічних способами. Це дозволяє отримати специфічні властивості крохмалю за рахунок зміни просторої структури, вибіркової зміни гідроксильних груп на карбонільні або карбоксильні та ін.

Кислотна модифікація крохмалю проходить при температурі нижче точки клейстеризації крохмалю. Використовуючи різні види крохмалю та змінюючи умови гідролізу (реагенти, температура, час обробки, рН суспензії) можна одержувати продукти модифікації, які відрізняються за властивостями та мають практичну цінність.

Під час гідролізу крохмалю під дією кислот спочатку має місце послаблення і розрив асоціативних зв'язків між макромолекулами амілози і амілопектину. Це супроводжується порушенням структури крохмальних зерен і утворенням гомогенної маси. Далі відбувається розрив α -D-(1,4)- і α -D-(1,6) - зв'язків з приєднанням за місцем розриву молекули води. В процесі гідролізу нарастає число вільних альдегідних груп, зменшується ступінь полімеризації. У міру проходження гідролізу і наростання редукуючих (відновних) речовин вміст декстрину зменшується, глюкози – збільшується, концентрація мальтози, три- і тетрацукрів спочатку збільшується, потім їх кількість знижується. Разом з основним процесом – гідролізом крохмалю – відбуваються побічні реакції реверсії і розкладання глюкози.

Порівняно з нативним гідролізований крохмаль утворює низьков'язкі розчини, покращує прозорість розчинів та плівок на його основі та знижує здатність до ретроградації.

В роботі проводимо модифікацію кукурудзяного крохмалю лимонною кислотою. Модифікація полягає в тому, що створюються необхідні умови для реакції між ангідридним агентом (кислотою) і крохмалем.

Досліджуємо вплив концентрації лимонної кислоти (1 моль/л і 0,5 моль/л) та часу обробки (1,5; 2,0; 2,5 годин) на процес модифікації крохмалю. Зразки кукурудзяного крохмалю потрібно обробити кислотою та витримати у сушильній шафі при температурі 60 °C.

Вміст лимонної кислоти визначаємо методом титрування, для чого відбираємо пробу розчину об'ємом 5 мл і титруємо її 0,1 н розчином NaOH.

З дослідження розчинів, якими обробляли крохмаль, встановлюємо, як змінюється кількість карбоксильних груп. Якщо кількість карбоксильних груп знижується, то це показує що відбувається приєднання їх до крохмалю. Таким чином відбувається гідроліз і це впливає на ступень полімеризації модифікованого крохмалю.

Ступінь полімеризації досліджуємо віскозиметричним методом, зразки крохмалю розчиняємо у кадоксені (кадмійетилендіаміну). Визначаємо, як змінюються ступені полімеризації залежно від концентрації та часу обробки крохмалю лимонною кислотою. Це, в свою чергу, відкриває перспективи для одержання модифікованого крохмалю з прогнозованими властивостями.

Лабораторна робота №3.

Тема роботи: Якісні реакції для виявлення фальсифікації продуктів харчування.

Реактиви: молоко, крейда, хлоридна кислота, саліцилова кислота, розчин ферум (II) хлориду, 0,2 н розчин купрум (II) сульфату, концентрований розчин натрій гідроксиду, гліцерин, пиво, реактив Фелінга, спирт, зразки продуктів: борошно, сметана, сир, розчин йоду, розчини різної концентрації калій (натрій) нітриту, 1 %-ий розчин дифеніламіну в концентрованій сульфатній кислоті (кислоту можна замінити концентрованою ортофосфатною кислотою), соки огірка, томатів, моркви, капусти.

На сьогодні актуальними є проблеми негативного впливу шкідливих речовин на здоров'я та життєдіяльність людини у сучасних умовах. Ця проблема стає дуже актуальною. Хімічні речовини можуть потрапляти в їжу з навколишнього середовища або під час технологічного процесу, наприклад під час контакту з обладнанням, з пакувальним матеріалом під час транспортування та зберіганні.

Актуальність проблеми безпеки продуктів харчування з кожним роком зростає, оскільки саме забезпечення безпеки продовольчої сировини і продуктів харчування є одним з основних чинників, що визначають здоров'я людей і збереження генофонду. З погляду безпеки продуктів харчування значну небезпеку можуть представляти і деякі види фальсифікації харчових продуктів. Як правило, це види асортиментної фальсифікації, які можуть привести до використання небезпечних замінників. Види таких фальсифікацій різноманітні. Доцільно розрізняти 5 видів фальсифікації – асортиментну (видову), якісну, кількісну, кошторисну та інформаційну.

Останнім часом інтенсивно розвивається один із сучасних напрямів біотехнології – створення трансгенних продуктів харчування. Постійно зростає кількість нових трансгенних сільськогосподарських культур (буряки, картопля, соя, рис та інші). Відомо, що генетично модифіковані організми (ГМО) є результатом науково-технічного прогресу, який переслідує нібито найблагородніші цілі – боротьбу з бідністю, голодом, покращення умов праці, зменшення техногенного навантаження на природне середовище. ГМО

(генетично модифіковані організми) – це живі організми (тварини, рослини, бактерії та віруси), генотипи яких було штучно змінено за допомогою методів генної інженерії для надання їм певних корисних властивостей. У листопаді 2008 року в Україні було прийнято державний стандарт, відповідно до якого всі продукти харчування, що містять генетично модифіковані організми, потрібно маркувати. Небезпека ГМО полягає в тому, що наслідки їх впливу на навколишнє природне середовище, на людину, її життя та здоров'я досі не досліджені.

Методика визначення

Визначення крейди в молоці. Під час додавання до молока, що містить підмішану крейду, розчину хлоридної кислоти, відбувається виділення вуглекислого газу, що свідчить про фальсифікацію.

Визначення консервантів у молоці. В пробірку з фальсифікатом додати одну краплю 0,1 н розчину ферум (III) хлориду. Виникнення характерного забарвлення свідчить про фальсифікацію – додавання саліцилової кислоти.

Виявлення гліцерину. В пробірку з фальсифікатом додати 3 краплі розчину купрум (II) сульфату і 3 краплі концентрованого розчину лугу. Струсити. Виникнення характерного забарвлення свідчить про фальсифікацію пива – додавання гліцерину.

Якісне визначення сивушних олій у спиртових виробках. У пробірку налити 3-4 краплі реактиву Фелінга і додати розчин, який необхідно дослідити. Суміш нагріти.

Якісне визначення вмісту крохмалю в продуктах. У пробірки помістити зразки харчових продуктів і додати 1 краплю розчину йоду. Звернути увагу на колір. Зробити відповідні висновки.

Визначення якості вершкового масла. Залийте шматочок масла окропом. Якщо масло справжнє, воно відразу розтане і розпливеться. Якщо в маслі є рослинні жири, то в окропі воно розлетиться на шматочки.

Визначення якості сметани. Деякі виробники для покращення консистенції сметани використовують крохмаль. Його можна дуже легко виявити, змішавши йод з невеликою порцією сметани. Сметана, яка містить крохмаль посиніє.

Перевірити сметану на наявність рослинних жирів можна таким чином: розведіть ложку сметани в гарячій воді. Якщо у сметані є рослинні жири, вони будуть плавати на поверхні у вигляді згустків.

Якщо в сметану додали згущувач, то розчинивши ложку сметани у склянці води, ви побачите на дні осад.

Перевірка якості кисломолочного сиру. Наявність крохмалю перевіряється за допомогою йоду, як і у випадку перевірки молока і сметани.

Деякі виробники додають в сир рослинні жири. Залиште трохи сиру на ніч при кімнатній температурі. Якщо у складі кисломолочного сиру є пальмова або кокосова олія, вранці на ньому буде помітна жовта шкірочка.

Наявність пальмової олії в сирі можна виявити за допомогою ультрафіолетової лампи. Якщо продукт містить пальмову олію, то під ультрафіолетовою лампою, він буде світитися синім.

Щоб визначити, чи є в сирі рослинні жири, розтопіть шматочок сиру в мікрохвильовій печі. Якщо разом із розплавленим сиром з'явилася олія, значить в сирі є рослинні жири.

Перевірка якості меду. Розчиніть мед у воді і додайте трохи оцтової кислоти. Якщо з'явиться піна, то у мед додана крейда. Якщо налити мед на папір, а він розтечеться і утворить мокру пляму, значить у нього додали воду.

Якісне визначення вмісту нітратів у продуктах харчування. Плоди подрібнити і відтиснути натуральні соки, використання водяних витяжок не рекомендується. Якщо, для приготування соків, використовувати воду, то для чистоти експерименту, в кожному випадку кількість води повинна бути однаковою. Використовують соки, отримані з овочів вирощених в домашніх умовах та куплених в магазині і потім порівнюють отримані результати.

Контрольний дослід. У пробірку помістити 1 мл 1 %-го розчину калій нітрату, в іншу пробірку 1 мл 1 %-го розчину калій нітриту і додати в кожную з них 6 крапель 1 %-го розчину дифеніламіну. Звернути увагу на зміну забарвлення розчину. 1 краплю досліджуваного розчину помістити у вільне заглиблення планшета і додати 2 краплі 1 %-го розчину дифеніламіну. Зверніть увагу на зміну забарвлення розчину і зробіть висновок.

Тема 2 : Виробництво молочнокислих продуктів

Лабораторна робота №1.

Тема роботи: «Аналіз кисломолочних продуктів.

Визначення показників якості молока та молокопродуктів»

Молоко серед інших продуктів харчування займає одне з провідних місць. Наявність у ньому легкозасвоюваних органічних речовин (білків, жирів, вуглеводів), а також мінеральних елементів, необхідних організму, робить його незамінним харчовим продуктом.

За останні роки асортимент молока і особливо кисломолочних продуктів у нашій країні значно розширився як за рахунок вітчизняних, так і за рахунок імпортованих продуктів. Тому проблема встановлення натуральності молока й молочних продуктів, що надходять у роздрібну торговельну мережу та у підприємства громадського харчування, стоїть досить гостро.

Фальсифікація якості молока може відбуватися за рахунок розбавлення молока водою, додаванням до прокислого молока речовин лужного характеру (наприклад соди), додаванням до знежиреного молока крохмалю або борошна для підвищення його густини тощо, змішування молока зі рослинними продуктами. Деякі види фальсифікації молока можуть мати і більш неприємні наслідки. Так, змішування сирого і пастеризованого молока без відповідної інформації споживачів, що таке молоко в домашніх умовах обов'язково треба кип'ятити, може стати причиною важких захворювань внаслідок того, що з сирим молоком можуть потрапити небезпечні для здоров'я людини мікроорганізми.

Дослід №1. Визначення густини молока.

Для визначення густини молока використовують – ареометр. Передня частина ареометра – шкала. Визначати густину молока можна лише при температурі в межах від 15 до 25°C.

Реактиви: молоко придбане на ринку, фермерське молоко.

Обладнання: циліндр, ареометр АОН-1 (1000-1060).

У циліндр налити добре розмішаного молока. Чистий сухий ареометр повільно занурюють в циліндр з молоком до поділки 1,030 і залишають у спокої на 1-2 хв. Ареометр не повинен доторкатися до стінок циліндра. Записують покази ареометра та температуру молока.

Приклад. Температура +23°C, показ ареометра – 1,0305 г/мл (1030,5 кг/л).

Поправка на температуру $23-20 = 3^{\circ}\text{C}$, $3 \cdot 0,2 = 0,6$.

Густина молока з поправкою, вираженою в градусах ареометра, складає $1030,5 + 0,6 = 1031,1$ кг/л.

Примітка:

Густина молока (об'ємна маса) – це маса молока в одиниці об'єму при температурі 20°C. Цей показник використовується для перерахунку кількості молока, вираженого в кілограмах у літри і навпаки. Густина коров'ячого молока коливається в межах 1,027-1,032 кг/л.

Дослід №2. Якісна проба на воду в молоці.

Реактиви: 10% розчин K_2CrO_4 , 0,5% розчин AgNO_3 .

Об'єкти дослідження: молоко придбане на ринку.

Обладнання: пробірка, піпетки.

Методика визначення

У пробірку наливають 2 мл досліджуваного молока, додають 2 краплі 10% розчину K_2CrO_4 і 2 мл 0,5% розчину AgNO_3 . Кондиційне молоко корови забарвлюється в лимонно-жовтий колір, розбавлене водою - в цегляно-червоний колір різної інтенсивності.

Примітка:

Проба Іохельсона є надійною при визначенні фальсифікації молока великою кількістю води (20-25%), але менше чіткою при меншій кількості доливої води.

Дослід №3. Виявлення крохмалю і борошна в молоці.

Об'єкти дослідження: молоко придбане на ринку.

Реактиви: спиртовий розчин I_2 .

Обладнання: пробірка, піпетки.

Методика визначення

У пробірку змішати по 5 мл молока і 3 краплі спиртового розчину I_2 . Встановити зміну забарвлення - при наявності крохмалю молоко забарвлюється в синій колір, без крохмалю - в блідо-жовтий.

Примітка:

Крохмаль або муку додають до молока для збільшення його в'язкості. Виявлення їх засноване на реакції йоду з крохмалем, який забарвлюється від дії йоду в синій колір.

Дослід №4. Визначення формаліну у молоці.

Реактиви: H_2SO_4 .

Об'єкти дослідження: молоко придбане на ринку.

Обладнання: пробірка, піпетки.

Методика визначення

У пробірку вносять 1 мл H_2SO_4 . Обережно, не допускаючи змішування, по стінці доливають 1 мл молока. При наявності в молоці формаліну на межі рідин утворюється фіолетове або темно-синє кільце, при відсутності його кільце має жовте забарвлення.

Примітка:

Формалін є консервуючою речовиною, яку використовують для знищення кисломолочних бактерій молока. Законсервоване формаліном молоко непридатне до вживання.

Дослід №5. Визначення соди та аміаку у молоці.

Об'єкти дослідження: молоко придбане на ринку, фермерське молоко.

Реактиви: бромтимоловий голубий.

Обладнання: пробірка, піпетки.

Методика визначення

У суху пробірку наливають 5 мл досліджуваного молока і обережно по стінці додають 3-5 крапель розчину бромтимолового голубого. Через 10 хв спостерігають за зміною забарвлення кільцевого шару. Жовте забарвлення кільцевого шару вказує на відсутність соди в молоці.

Примітка:

З метою зниження кислотності молока і попередження зсідання виробники до нього іноді додають соду чи аміак. Таке молоко вважається фальсифікованим. Додавання соди до молока не гальмує розвиток у ньому гнильних бактерій. Чутливість методу складає 0,05 % добавленого карбонату або бікарбонату.

Метод аналізу заснований на визначення рН молока. рН свіжого молока 6,55-6,75. При наявності соди значення рН зміщуються в лужну сторону ($\text{pH} > 6,6$). Присутність аміаку чи соди визначають, порівнюючи забарвлення, яке змінюється від лимонного (слабокисле середовище $\text{pH} 5,3-6,6$ - відсутність соди) до синього ($\text{pH} > 7,6$ - лужне середовище).

Дослід №6. Визначення вмісту в молоці перекису гідрогену.

Об'єкти дослідження: сире молоко придбане на ринку, пастеризоване молоко.

Реактиви: розчин йодистокалієвого крохмалю.

Обладнання: пробірка, піпетки.

Методика визначення

У пробірку наливають 1 мл досліджуваного молока, додають дві краплі розчину сірчаної кислоти і 0,2 мл крохмального розчину йодистого калію. Через 10 хв спостерігають за зміною кольору розчину в пробірці. Поява окремих плям синього кольору свідчить про присутність H_2O_2 у молоці.

Примітка:

Пероксид гідрогену (пергідроль 30 %) додають інколи в молоко для попередження його скисання. Метод базується на взаємодії перекису гідрогену з йодистим калієм, виділенням йоду, який дає з крохмалем синє забарвлення. Чутливість методу 0,001% перекису гідрогену.

Дослід №7. Визначення вмісту солей кальцію в молоці.

Молоко і кисломолочні продукти – це основне джерело природного надходження кальцію в організм.

Метод комплексонометричного титрування ґрунтується на взаємодії кальцію з трилоном-Б, при цьому кальцій переходить із сполук з білками і фосфором у розчин. Надмір трилону-Б, який не прореагував з кальцієм, відтитровують розчином хлориду кальцію.

Реактиви: 0,1 моль/л розчин трилону-Б, 8% розчину NaOH , 0,1 моль/л розчин CaCl_2 , суміш мурексиду з хлоридом натрію (1:20).

Обладнання: колба – 250 мл, піпетки, бюретки.

Методика визначення

До 5 мл молока в колбі доливають 90-95 мл дистильованої води, 5 мл 8% розчину NaOH , з бюретки відмірюють точно 3,5мл 0,1 моль/л розчину трилону-Б, перемішують і залишають на 2 хв.

На кінчику ножа вносять близько, 0,04 г сухої суміші індикатора мурексиду з хлоридом натрію, розчин забарвлюється в бузковий колір. Вміст колби титрують 0,1 моль/л розчином CaCl_2 , додаючи його по краплях при безперервному перемішуванні до появи стійкого рожевого забарвлення.

Потім з бюретки знову доливають по краплях розчин трилону-Б до появи стійкого бузкового кольору. Через 1 хв, у разі зникнення забарвлення, додають ще одну краплю трилону-Б.

За бюреткою вимірюють загальний об'єм розчину трилону-Б, доданого в колбу.

Розрахунки:

Масову частку кальцію у відсотках обчислюють за формулою:

$$C_{Ca} = \frac{a \cdot 2 \cdot 100 \cdot 0,97}{V_1}$$

де а - об'єм 0,1 моль/дм³ розчину трилону-Б, що зв'язаний з кальцієм, мл;

2 - маса кальцію, що відповідає 1 мл 0,1 моль/л розчину трилону-Б, мг;

V - об'єм молока, взятого для аналізу, мл;

0,97 – густина молока, г/мл.

Примітка:

У 100 г молока міститься 125 мг кальцію, а в знежиреному молоці кальцію трохи більше.

Дослід №8. Визначення активної кислотності (pH) молока.

Активна кислотність молока характеризується концентрацією водневих іонів і виражається величиною pH. Для визначення водневого показника застосовують різні методи: за допомогою індикаторів (приблизний метод) та потенціометричний метод (більш точний), з використанням іономірів, pH – метрів.

Реактиви: стандартні буферні розчини.

Обладнання: pH-метр, мірний циліндр.

Методика визначення

pH-метр вмикають і перевіряють показники екстинкції за стандартними буферними розчинами для pH-метрії. Після промивання електродів дистильованою водою в стаканчик наливають 40 мл молока і занурюють у нього електроди. Температурний компенсатор установлюють на температуру молока. Після зупинення показника, записують значення за шкалою приладу.

Примітка:

Водневий показник молока коливається (залежно від складу молока) в досить вузьких межах – від 6,55 до 6,75.

Дослід №9. Визначення титрованої кислотності молока.

Принцип методу визначення кислотності полягає в нейтралізації (титруванні) кислих солей, білків, вільних кислот та інших кислих сполук молока розчином лугу в присутності індикатора фенолфталеїну.

Об'єкти дослідження: сире молоко придбане на ринку, пастеризоване молоко.

Реактиви: 0,1 н розчин NaOH, 1 % спиртовий розчин фенолфталеїну.

Обладнання: колби конічні місткістю 150 мл, піпетки, бюретка.

Методика визначення

В конічну колбу місткістю 150мл відміряють піпеткою 10 мл молокопродукту, додають 20 мл дистильованої води і 3 краплі фенолфталеїну. Суміш ретельно перемішують і титрують 0,1 н розчином NaOH до слабо рожевого забарвлення, що не зникає протягом 1 хв.

Розрахунок:

Титровану кислотність молока та кисломолочних продуктів вимірюють в градусах Тернера підраховують за формулою:

$$X = \frac{V \cdot N \cdot 100}{0,1 \cdot V_1}$$

де V – об'єм розчину лугу, який витрачено на титрування, мл;

N – нормальність розчину лугу;

V₁ – об'єм молока, взятого для аналізу, мл;

100 – об'єм молока, для якого потрібно розрахувати градуси кислотності.

Примітка:

Молоко задовільної якості має кислотність 16-19°. При меншій кислотності вважається розведеним водою. Вища кислотність свідчить про те, що молоко скисає.

Показник кислотності характеризує свіжість молока і є одним із головних показників при визначенні якості молока. Титровану кислотність молока виражають в градусах Тернера (°Т), що показує кількість мілілітрів 0,1 н розчину NaOH, необхідну для нейтралізації 100 мл молока вдвічі розведеного водою.

Співвідношення між рН і титрованою кислотністю визначають за допомогою таблиці.

Таблиця 2.

Титрована кислотність, °Т	Коливання рН
16	6,75 – 6,72
17	6,71 – 6,67
18	6,66 – 6,61
19	6,60 – 6,55
20	6,54 – 6,49
21	6,48 – 6,44
22	6,43 – 6,39

Визначивши кислотність, можна говорити про якісні характеристики молока та його технологічну відповідність.

Таблиця 3.

Показники якості молока залежно від кислотності

Кислотність молока, °Т	Характеристика молока за Давидовим Г.Б.
< 15	Молоко фальсифіковане або отримане від хворих корів та корів у кінці лактації
15-19	Нормальне свіже молоко
20-21	Молоко першого місяця лактації
22	Кисле, але при кип'ятінні не згортається
26	При кип'ятінні згортається
30	Згортається при температурі 77°C
40	До 65°C
50	До 40°C

Лабораторна робота №2.

Тема роботи: «Аналіз заквасок йогуртів».

Дослід 1: Визначення активності пероксидази за реакцією з йодистокалієвим крохмалем.

Пероксидаза інактивується при температурі не нижче +80°C витримкою 20-30 секунд. Метод ґрунтується на розкладі перекису гідрогену ферментом пероксидазою, яка міститься в молоці і молочних продуктах. Вивільнений при розкладі H_2O_2 активний O_2 окислює KI, вивільняючи I_2 , який утворює з крохмалем сполуку синього кольору.

Об'єкти дослідження: сире молоко придбане на ринку, пастеризоване молоко.

Реактиви: розчин йодистокалієвого крохмалю, 0,5% розчин H_2O_2 .

Приготування йодистокалієвого крохмалю: 3 г крохмалю змішують з 5-10 мл дистильованої холодної води до отримання однорідної маси. Окремо в колбі доводять до кипіння 100 мл дистильованої води і при безперервному помішуванні доливають воду до розведеного крохмалю, недопускаючи

утворення грудочок. Одержаний розчин доводять до кипіння. Після охолодження до розчину крохмалю додають 3 г йодистого калію, перемішуючи до розчинення кристалів KI. Розчин зберігають у темному прохолодному місці не більше 2 днів.

Методика визначення

У пробірку відміряти 5 мл молокопродукту, додати 5 крапель розчину йодистокалієвого крохмалю і 5 крапель 0,5%-ного розчину перекису водню. Круговими рухами перемішати вміст пробірок після додавання кожного з реактивів.

Визначають наявність пероксидази за зміною кольору. При відсутності ферменту пероксидази в молоці колір вмісту в пробірці не змінюється. При наявності пероксидази в молоці вміст пробірки набирає темно-синього кольору.

Поява забарвлення в пробірках пізніше, ніж через 2 хв після додавання йодистокалієвого крохмалю і H_2O_2 , може вказувати на відсутність пастеризації.

Дослід 2: Визначення активності молочнокислих бактерій.

Об'єкти дослідження: чисті культури молочнокислих бактерій, житні закваски, рідкі дріжджі, опара, тісто.

Реактиви: 0,05%-й водний розчин метиленової сині, пробірки, стерильна вода, мірний циліндр місткістю 25 см³.

Методика визначення

1. Наважку проби 10 г ретельно розтирають у ступці із дворазовою кількістю води, попередньо нагрітої до 40 °С, доливаючи воду поступово невеликими порціями (чисті культури молочнокислих бактерій і житні закваски досліджують без розбавлення водою, відбираючи по 20 г зразка). Приготовлену пробу (по 10 г) за допомогою мірного циліндра на 10 см³ переносять у дві пробірки. У дослідну пробірку додають 1 см³ 0,05 %-го водного розчину янус-грюн або 1 см³ 0,05 %-го водного розчину метиленової сині. Вміст пробірки ретельно перемішують до рівномірного розподілу барвника. Друга пробірка слугує контролем. Обидві пробірки поміщають у водяну баню при температурі 40 °С.

2. Активність молочнокислих бактерій у напівфабрикатах визначається за швидкістю переходу блакитного забарвлення метиленової сині (або синьо-зеленого забарвлення янус-грюн) у безбарвне, аналогічне з кольорами середньої частини проби в контрольній пробірці. При цьому необхідно уникати дії прямих сонячних променів під час аналізу, що може змінити результати визначення.

3. За експериментальним даними відновлення забарвлення янусгрюн відбувається при аналізі опари приблизно за 35- 50 хв., тіста — за 40- 50 хв. і на кінець вистоювання тіста — за 35 -45 хв. У житньому тісті тривалість аналізу становить 50- 75 хв. Зробити висновки.

Дослід 3: Дослідження морфологічних особливостей молочнокислих бактерій.

Об'єкти дослідження: кисломолочні продукти (кефір, сметана, сир, ряжанка, йогурт, кисломолочні біфідопродукти, кисломолочний продукт з ацидофільної паличкою); рідкі закваски на стерильному молоці.

Реактиви: мікроскоп; спиртівка; предметні скла; бактеріологічного петлі; імерсійне масло; фарба Муромцева; фільтрувальна папір; лоток з рейками; промивалка.

Методика визначення

1. Для приготування препарату на чисте предметне скельце наносять петлею невелику краплю досліджуваного матеріалу та рівномірно розподіляють на площині близько 1 см². В якості досліджуваного матеріалу використовують сквашене молоко або інший молочнокислий продукт.

2. При дослідженні сиру та сирних виробів на скло наносять краплю води, вводять в неї петлею продукт, ретельно перемішують та розтирають на площині 1 см². Препарат висушують при кімнатній температурі, фіксують на полум'ї пальника та фарбують метиленовим синім. Метиленовий синій - кращий барвник для молочнокислих бактерій в молоці, тому що він слабо зафарбовує основний фон (казеїн) та добре - клітини. Під час досліджень, в зразку добре видно дрібні округлі клітини *Streptococcus lactis* у вигляді коротких ланцюжків. Вони накопичують до 1% молочної кислоти. (рис.35).

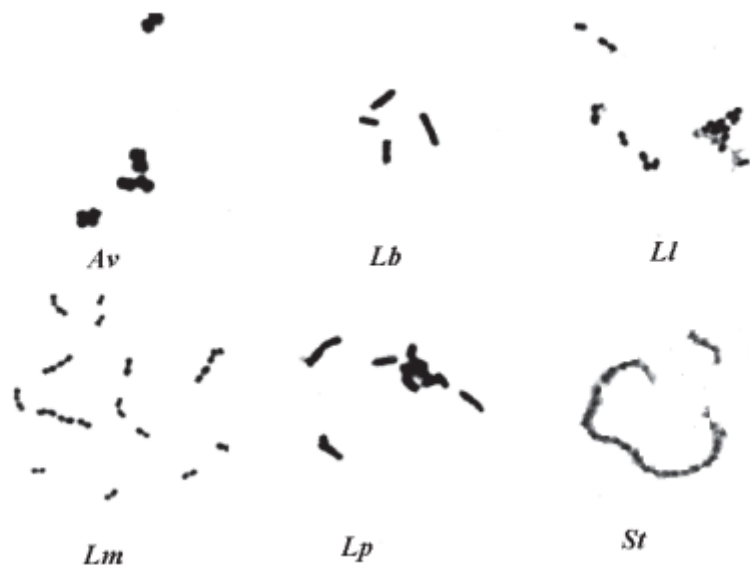


Рис. 1. Молочнокислі бактерії, зафарбовані метиленовим синім:

A_v – *Aerococcus viridians*; *L_b* – *Lactobacillus bulgaricus*; *L_l* – *Lactococcus lactis*; *L_m* – *Leuconostoc mesenteroides*; *L_p* – *Lactobacillus plantarum*; *S_t* – *Streptococcus thermophilus*

Оптимальна температура для розвитку мікроорганізмів – 30°C, вони кислотостійкі, накопичують до 3,5% молочної кислоти. В полі зору можуть бути молочнокислі стрептококи (*Streptococcus lactis*, *S. cremoris*) – шароподібні клітини, розташовані вигляді коротких чи довгих ланцюжків.

Палички довжиною 4-5 мкм *Lactobacillus bulgaricus*, *L. acidophilus*). Часто у прокислих молочних продуктах можна спостерігати величезні клітини молочної цвілі (*Oidium lactis*), цвільові гриби (*Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*), дріжджі (*Torula amara*, *T. lactis*), спороутворюючі бактерії родів *Bacillus* та *Clostridium*.

3. Після інкубації накопичувальної культури молочнокислих бактерій відзначають згортання молока, характер росту мікроорганізмів (утворення згустку – щільного, рихлого, слизового) і газоутворення. Приготувати препарат фіксованих клітин, мікроскопію вати, замальовати. Враховуючи особливість субстрату (молоко), препарат фіксованих клітин готують так. На предметне скельце з пробірки нанести краплю культуральної рідини, яку рівномірно розмазати покривним склом. Мазок висушити і одночасно знежирити сумішшю спирту та ефіру (1:1) упродовж 10 хв., яку безпосередньо наносити на мазок. Після випаровування суміш налити повторно. Висушений мазок фарбувати розчином метиленового синього за Лаффлером. При мікроскопіюванні звертають увагу на співвідношення кокових та паличковидних бактерій в різних мазках, виявляють клітини дріжджів в мазках з кефіру. Після ретельного мікроскопіювання замальовують мікрофлору молочнокислих продуктів.

Дослід 4: Підготовка молочнокислих бактерій до ферментаційного процесу. Контроль якості заквасок

Розрізняють однокомпонентні, одновидові (одноштамові, багатоштамові) і змішані закваски.

Одноштамові заквашувальні культури — закваска, що складається лише з одного штаму певного виду бактерій. Багатоштамова одновидова закваска містить один або кілька штамів, які належать до одного виду бактерій.

Багатоштамова закваска може містити багато штамів, що належать до різних видів бактерій і навіть родів. Вона може бути сумішшю заквашувальних культур невизначеного складу і багатоштамовою заквашувальною культурою.

До мезофільних молочнокислих бактерій, що використовують як заквашувальні культури, належать такі види та підвиди, як: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lc.lactis* subsp. *cremoris*, *Lc.lactis* subsp. *lactis bivovardiacetilactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Lactococcus casei*. Їх можна застосовувати як самостійно, так і комбінувати. Як мезофільну одновидову заквашувальну культуру можна використати *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Заквашувальні культури випускають у рідкому, замороженому та ліофільно висушеному стані.

Якість заквасок контролюють за активністю та чистотою. Активність закваски контролюють за кількістю мікрофлори, кислотністю та тривалістю заквашування. Виробничі закваски для сиру кисломолочного, сметани, простокваші повинні мати кислотність 80-85°Т, для масла і сирів з низькою температурою другого нагріву — 90-100°Т. Кислотність ацидофільної, болгарської заквасок має не перевищувати 95-110°Т, кефірної 95-100°Т, закваски для кумису — 130-160°Т.

Тривалість заквашування при внесенні материнської закваски молочнокислих стрептококів (1-3 %) становить 6-8 год., молочнокислих паличок (0,5-1 %) — 4-6 год.

Попередній мікробіологічний аналіз закваски проводять щоденно безпосереднім мікроскопуванням пофарбованих препаратів. Мінімальна кількість молочнокислих бактерій неконцентрованих заквасок становить $1 \cdot 10^8$ КУО/г.

Мікробіологічний контроль якості заквасок передбачає визначення кількості життєздатних бактерій та сторонніх мікроорганізмів, перелік яких наведено нижче. Слід зазначити, що у заквасках не повинно бути сторонньої мікрофлори.

Об'єкти дослідження: різні види заквасок

Реактиви: технічні ваги, стерильний посуд для приготування наважок, колби зі стерильною водопровідною водою, стерильні чашки Петрі, стерильні піпетки, стерильна вода в пробірках, стерильні живильні середовища.

Методика визначення

1. *Відбирання проб заквасок сухих та рідких, бактеріальних концентратів, бактеріальних препаратів прямого внесення.* Пробу рідких заквасок відбирають стерильною піпеткою об'ємом не менше ніж 10 см^3 з кожного пакування та переносять у одну ємність.

Маса проби для контролювання заквасок сухих, бактеріальних концентратів, бактеріальних препаратів прямого внесення повинна бути (30 ± 2) г. Відібрані проби перед дослідженням перемішують та нейтралізують. Для цього у стерильну пробірку або колбу, відбирають стерильною піпеткою 10 см^3 закваски, що аналізують, додають 1 см^3 стерильного розчину двовуглекислого натрію з масовою концентрацією 100 г/дм^3 , вміст ємності перемішують.

2. *Мікроскопування препарату.* Для приготування мікроскопічного препарату на чисте знежирене предметне скло петлею наносять невелику краплю досліджуваного матеріалу і розподіляють на ділянці площею $(1 \pm 0,2)$ см^2 . Препарат сушать при температурі $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$, фіксують над полум'ям спиртівки і фарбують метиленовим синім. Мікроскопічні препарати заквасок розглядають у 10 полях зору. Відмічають морфологію клітин.

Визначення кількості життєздатних клітин проводять висівом на селективні середовища. Для визначення кількості молочнокислих бактерій у заквашувальних культурах змішують відповідне їх розведення з розплавленим і охолодженим до температури $(47 \pm 1)^\circ\text{C}$ середовищем МРС або ГА. Після затвердіння чашки Петрі перевертають догори дном і інкубують при температурі $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ протягом 72 год. в аеробних умовах для лактококів та при температурі $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ протягом 48 год. також в аеробних умовах для *S. thermophilus*.

У багатоштамових заквасках, що містять, *Lb.delbrueckii subsp.bulgaricus* і *Lb.acidophilus* під час інкубування в анаеробних умовах при температурі $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ протягом 72 год. визначають *Lb.delbrueckii subsp. bulgaricus*, а при

температурі $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ протягом 72 год. — *Lb.acidophilus*. Після інкубування підраховують усі утворені колонії.

Після інкубування підраховують загальну кількість колоній і колоній із прозорими зонами. Для того щоб розрізнити бактерій роду *Lactococcus* від *Leuconostoc*, у кожен чашку Петрі додають 0,5 см³ X-gal-розчину, який розтирають по поверхні чашки стерильним шпателем Дригальського. Чашки Петрі інкубують 4 год. при температурі $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Блакитні колонії з прозорою зоною або без неї — це *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lc.lactis* subsp. *cremoris*, *Lc.lactis* subsp. *lactis*, *bivovar diacetylactis* — білі з прозорою зоною. Зробити висновок про якість заквасок.

Дослід 5: Технологія заквашування живильної основи.

Приготування заквасок методом накопичувальних культур

Об'єкти дослідження: стерильне молоко, закваска молочнокислих бактерій (йогурт Активія)

Реактиви: термостат, мірні циліндри, термометр, термос.

Методика визначення

1. Вилити молоко у посуд і довести до кипіння, на мінімальному вогні прокип'ятити 5хв.
2. Охолодити молоко до температури $37-43^\circ\text{C}$, зняти пінку.
3. Якщо використовуєте готовий йогурт (Активія) - влити вміст упаковки в молоко і ретельно перемішати. Якщо використовуєте суху закваску - розвести її столовою ложкою молока в флаконі і влити розведену закваску в молоко.
4. Перелити молоко з закваскою у пробірки та помістити їх в термостат при температурою $30-35^\circ\text{C}$ на 5-6 годин. Важливо не рухати їх протягом цього часу.
5. Перелити йогурт в чисту посудину, закрити кришкою і поставити в холодильник на кілька годин, де він ще трішки загусне.
6. Після утворення у молоці твердого згустку можна розпочинати дослідження аналізу бродіння і визначення молочної кислоти.

Дослід 6: Аналіз бродіння

По закінченні бродіння у зброженому молоці визначають: 1) мікроскопічну картину зброженого молока (замальовують); 2) кислотність, що титрується, за Тернером; якщо кислотність досягає $80-100^\circ\text{T}$, то бродіння пройшло добре; 3) якісні реакції на молочну кислоту.

Вивчення морфології клітин. Готують мазок із сироватки зсілого молока, сушать, фіксують над полум'ям пальника. Жир знімають, поклавши фільтрувальний папір на гарячий мазок. Мазок фарбують метиленовою синю (барвник добре забарвлює мікроорганізми і слабо — казеїн молока), мікроскопують і замальовують в протоколі. В якості посівного матеріалу використовують пробірки з молоком, у яких щільний згусток утворився раніш, та мікробіологічна картина яких складається переважно з однорідної культури паличок або стрептококів. Препарати розглядають при великому збільшенні 15х40 або 15х90.

Визначення кислотності, що титрується, в градусах Тернера.
Кислотність молока за Тернером визначають титруванням децінормальним розчином лугу з індикатором фенолфталеїном. Для титрування у конічну колбу вносять 10 мл молока, розбавляють 20 мл дистильованої води і додають 2-3 краплі 1%-вого спиртового розчину фенолфталеїну. Суміш старанно перемішують і титрують при постійному збовтуванні 0,1 н розчином їдкого натрію (або калію) до рожевого забарвлення, що не змінюється протягом 1 хвилини. Кількість 0,1 н розчину лугу, витрачену на титрування, множать на 10 і одержують градуси кислотності Тернера, що показують кількість (мл) 0,1 н їдкого натрію, що було витрачено на нейтралізацію 100 мл молока. 1° Тернера відповідає 9 мг молочної кислоти.

Дослід 7: Визначення молочної кислоти в кислому молоці.

Об'єкти дослідження: кисле молоко, йогурт

Реактиви: 10%-го розчину сірчаної кислоти, 20%-ий розчин марганцевокислого калію, паперовий фільтр, аміачний розчин азотнокислого срібла, 5%-ві розчини карболової кислоти і хлорного заліза (1:2), термостат, мірні циліндри, термометр, термос.

Методика визначення

1. Переведення молочної кислоти в альдегід. Визначають молочну кислоту в кислому молоці якісною реакцією – отриманням оцтового альдегіду.

Кисле молоко відфільтрувати через паперовий фільтр. До 10 мл фільтрату додати 1 мл 10%-го розчину сірчаної кислоти. Нагріти до кипіння і додати по краплях 2 чи 20%-ий розчин марганцевокислого калію. Молочна кислота майже вся переходить в оцтовий альдегід, який виявляється на паперовому фільтрі, змоченому аміачним розчином азотнокислого срібла. Для цього фільтрувальним папером покривають шийку колби, у якій проводять визначення: при нагріванні колби оцтовий альдегід випаровується, і при взаємодії з аміачним розчином срібла, викликає почорніння фільтрувального паперу.

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

Лабораторна робота №3.

Тема роботи: «Кислотна коагуляція»

Дослід 1: Виділення та дослідження властивостей казеїну

Об'єкти дослідження: сичужний фермент; закваска; молоко.

Реактиви: колби конічні місткістю 100 і 200 см³ ; циліндр мірний місткістю 100 см³ ; бюретка місткістю 25 см³ ; мірна піпетка місткістю 50 см³ ; воронка; паперовий фільтр; 40%-й водний розчин CaCl₂; віскозиметр; прилад для визначення коефіцієнта розтікання; міліметровка; скло.

Методика визначення

Казеїн молока володіє кислими властивостями, тому здатний взаємодіяти з лугом. У зв'язку з чим, масову частку казеїну можна визначити з різниці обсягів лугу, що пішла на нейтралізацію молока і безказеїнової сироватки.

1 етап. У конічну колбу вносять 20 мл молока і 80 мл дистильованої води (20°C). Вміст колби перемішують і титрують розчином сірчаної кислоти 0,05 моль/дм при постійному помішуванні до випадання казеїну в осад великими пластівцями, використовуючи при цьому індикаторний папір до настання значення рН = 4,6-4,7. Об'єм розчину сірчаної кислоти (V_k), що пішла на осадження казеїну, записують.

Через 3-5 хв. після утворення осаду казеїну рідину фільтрують через сухий складчастий фільтр в конічну колбу місткістю 200 см³. Далі 50 мл фільтрату піпеткою переносять у конічну колбу місткістю 100 мл, додають 3-5 крапель 1%-ного розчину фенолфталеїну і титрують розчином гідроксиду натрію 0,1 моль/дм до слабо-рожевого забарвлення, не зникаючого протягом 30 с. Об'єм лугу (V) що пішов на титрування, записують.

2 етап. У конічну колбу вносять 20 мл молока, 80 мл дистильованої води і стільки ж сірчаної кислоти (0,05 моль/дм), скільки було потрібно на осадження казеїну на першому етапі, додають 3-5 крапель 1%-ного розчину фенолфталеїну, перемішують і титрують розчином гідроксиду натрію так само, як вище. Об'єм розчину лугу (V_2), що пішов на титрування, записують.

Спочатку за наведеною нижче формулою розраховують обсяг лугу (X), який пішов на титрування всього розчину (молоко + вода + кислота): Потім розраховують масову частку казеїну K (в %) за формулою:

$$X = \frac{(100 + V_k) \cdot V_1}{50} \text{ (см}^3\text{)},$$

де V_k - об'єм розчину сірчаної кислоти, що було витрачено на осадження казеїну, мл; V_1 - об'єм розчину гідроксиду натрію, що було витрачено на титрування 50 мл фільтрату, мл; 50 – вихідний об'єм розчину. Потім розраховують масову частку казеїну K (у %) за формулою:

$$K = \frac{(V_2 - X) \cdot 0,1131 \cdot 100}{m} = (V_2 - X) \cdot 0,5655,$$

де V_2 - об'єм розчину гідроксиду натрію, що було витрачено на титрування на другому етапі роботи, см³ ; X - розрахований об'єм розчину гідроксиду натрію, витрачений на титрування на першому етапі, см³ ; 0,1131 - маса казеїну, відповідна 1 мл розчину гідроксиду натрію з еквівалентною концентрацією 0,1 моль/дм³ , г; m - об'єм молока, що було взято на дослідження, мл (20 мл).

Дослід 2: Механізм процесу сичужної коагуляції казеїну.

Об'єкти дослідження: молоко, сичужний фермент; закваска.

Реактиви: колби конічні місткістю 100 і 200 см³ ; циліндр мірний місткістю 100 см³ ; бюретка місткістю 25 см³ ; мірна піпетка місткістю 50 см³ ; воронка; паперовий фільтр; 40%-й водний розчин CaCl₂; молоко; віскозиметр; прилад для визначення коефіцієнта розтікання; міліметрівка; скло.

Методика визначення

1. Молоко (масою близько 600 г) пастеризують при температурі 70-72° С і витримують 20-25 с.
2. Потім вносять CaCl₂ у вигляді 40%-ного водного розчину (прозорого, безбарвного) у кількості 10-40, іноді 60 г безводної солі на кожні 100 кг молока.
3. Після чого вносять закваску, кількість якої залежить від виду вироблюваного сиру, ступеня зрілості молока, активності закваски і становить 0,5-2,5% маси нормалізованого молока. На швидкість згортання молока сичужним ферментом впливають рН середовища і концентрація солей кальцію. Оптимальне значення рН 6,0-6,4. При додаванні солей кальцію прискорюється коагуляція, але до певної межі; при надлишку солі процес гальмується.
4. Сичужний фермент (доза - 1 г ферменту стандартної активності на кожні 100 кг молока) вносять у молоко у вигляді 2,5%-ного водного розчину при ретельному перемішуванні, яке триває ще 3-5 хв.
5. Потім підготовлене молоко розливають рівними порціями 6-8 колб або стаканчики, які поміщають у термостат з температурою, зазначеною викладачем, і залишають у спокої. З інтервалом у 5 хв. виймають по одній колбі (склянці) і визначають зміну реологічних характеристик молока в динаміці аж до утворення сичужного згустку.
6. За формуванням згустку можна спостерігати по зміні в'язкості молока (за допомогою різних віскозиметрів), а також побічно.
7. На підставі отриманих даних будують реограму процесу сичужного згортання молока, тобто графік зміни в'язкості залежно від тривалості згортання молока. Проводять порівняльний аналіз отриманих даних з відомими літературними.

Лабораторна робота №4.

Тема роботи: «Аналіз продуктів сироваріння».

Дослід: Визначення вмісту загального білка і казеїну в молоці методом формалінового титрування.

Метод ґрунтується на тому, що водний нейтральний розчин амінокислот у присутності нейтрального формаліну здатний підвищувати кислотність з утворенням сполук, в яких аміногрупи заміщуються групою CH₂. Вільну групу COOH відтитровують лугом.

Реактиви: 0,1 н розчин NaOH, 1% спиртовий розчин фенолфталеїну, 30-40% формальдегід.

Обладнання: колба – 100 мл, піпетки, бюретки.

Методика визначення

У колбу на 50-100 мл відміряють 10 мл молока, додають 10 крапель 1% спиртового розчину фенолфталеїну і розмішують. Титрують 0,1 н розчином NaOH до появи світло-рожевого забарвлення, яке незникає протягом 1 хв.

У колбу додають 2 мл формаліну, після чого світло-рожеве забарвлення зникає. У бюретці відмічають рівень лугу (V_1) і вміст колби знову відтитровують до світло-рожевого забарвлення і показники бюретки знову відмічають (V_2).

Для встановлення вмісту загального білка кількість 0,1 н. розчину лугу, що пішла на титрування після додавання формаліну (V_2), множать на коефіцієнт 1,94, а для визначення вмісту казеїну – на коефіцієнт 1,51. Отримані значення є відсотковим вмістом загального білка та казеїну в молоці.

Примітка:

Вміст білків в молоці корів в середньому становить 3,3%, а вміст казеїну 2,7%.

Тема 3. Визначення якості хлібопекарських дріжджів.

Лабораторна робота № 1

Тема роботи: Оцінка мікробної чистоти та придатності дріжджів для виробництва хліба.

Дослід №1. Визначення морфології дріжджів в препараті "Розтиснена крапля".

Мікробна чистота дріжджів визначається встановленням морфології дріжджів та наявності інших клітин мікроорганізмів (загальна бактеріальна засміченість (ЗБЗ) в біомасі основного штаму), зокрема для чистих пресованих хлібопекарських дріжджів мікробне число (МЧ) становить 12 млрд клітин *Sacchromyces cerevisiae*.

Реактиви: дріжджі (хлібопекарські пресовані та сухі, пивні).

Методика визначення

Готують незабарвлений препарат "розтиснена крапля" і розглядають під мікроскопом (об'єктив 40x15). Визначають форму клітин, наявність вакуолей. Готують 0,1% суспензію пресованих дріжджів, розтираючи 0,1г дріжджів в ступці з 2 мл стерильної водопровідної води, відтак зливають в мірну колбу на 100 мл та доводять до мітки водою. Суспензію гомогенізують, збовтуючи, наносять на сітку камери Горяєва-Тома, встановлюють на предметний столик мікроскопа. Підрахунок проводять з об'єктивом 8 через 3...5хв з моменту приготування препарату (клітини повинні осісти і бути видні в одній площині). Підраховують кількість клітин в 10 великих та 20 малих квадратах сітки, переміщаючи її по діагоналі; враховують всі клітини, що лежать в квадратику сітки та перетинають верхню і праву сторону

квадрата. Після закінчення роботи камеру промивають водою та протирають серветкою.

Розрахунки

Визначають середнє число клітин в квадраті, а відтак, кількість клітин в 1мл суспензії (N) за формулою:

$$N = a \cdot 10^3 \cdot n / h \cdot S ,$$

де a - середнє число клітин в квадраті сітки;

n - розведення суспензії;

h - глибина камери, мм;

S - площа квадрата сітки, мм²;

10³- коефіцієнт перерахунку в мл;

Площа великого квадрата 1/25 мм², малого 1/44 мм², глибина камери 0,1мм.

Кількість дріжджових клітин в 1 г пресованих дріжджів розраховують за формулою:

$$X = N \cdot V / v ,$$

де N - кількість клітин в 1мл суспензії;

V - об'єм мірної колби, мл;

v - наважка пресованих дріжджів, г.

Примітка

Розміри дріжджів до 10 - 15 мкм вимірюють під мікроскопом мікрометром (окулярною лінійкою), вимірявши не менше 20 клітин і вказавши середні розміри.

Дослід №2. Визначення підйомної сили дріжджів.

Реактиви: дріжджі хлібопекарські пресовані, мука.

Методика визначення

2 - 3 г дріжджів поміщають в циліндр на 100 мл, розмішують з водою і доливають до мітки. 5 мл одержаної суспензії змішують в чашці Петрі з 6,5 г муки. Після замісу масі надають форму кулі, яку опускають в склянку з водою температури 320С. Склянку з кулькою витримують в термостаті при 350С доти, доки кулька не спливе на поверхню і відзначають час від моменту, коли опустили кульку у воду до того, як вона спливе на поверхню.

Примітка

Добрі пресовані дріжджі мають підйомну силу при визначенні за методом кульки (метод Островського) 15-25 хв.

Лабораторна робота № 2.

Тема роботи: Аналіз харчових хлібопекарських пресованих (сухих, пивних) дріжджів.

Хлібопекарські дріжджі одержують культивуванням швидкоростучих мас верхового бродіння *Saccharomices cerevisiae*.

Ріст дріжджів на вуглеводах (джерело енергії та вуглецю) веде до утворення органічних кислот, нейтральних продуктів та газів. Утворення кислот реєструють по зміні активної кислотності (pH) середовища, утворення газу - по виникненні піни та витісненні поплавка з середовища.

Для визначення технологічних властивостей (функціональної активності та життєздатності) дріжджів важливе значення має визначення їх морфології. Морфологію дріжджів вивчають під мікроскопом для забарвлених та незабарвлених препаратів при середніх та великих збільшеннях. У фазі росту дріжджі існують переважно у вигляді окремих клітин круглої, овальної, серповидної форми. Структурна організація: чітко диференційовані оболонки, ядро, органели, запасні живильні речовини (глікоген), вакуолі, резервні речовини (ліпіди). У старих та незрілих клітин глікоген відсутній.

Дослід №1 Визначення глікогену дріжджів в препараті "Розтиснена крапля"

Реактиви: дріжджі (хлібопекарські пресовані та сухі, пивні), гліцерин, спирт, розчин Люголя.

Методика визначення

На предметне скло наносять краплю рідини (гліцерин : спирт - 1:1), вносять в неї петлею краплю дріжджів та краплю розчину Люголя. Спостерігають зміну забарвлення.

Примітка:

Глікоген забарвлюється в червоно-бурий колір.

Дослід №2. Визначення вмісту ацетону.

Реактиви: дріжджі (хлібопекарські пресовані та сухі, пивні), глюкоза, пептон, K_2HPO_4 , 10%, 20% та 40% розчини КОН, креатин, 10% спиртовий розчин β -нафтолу.

Методика визначення

Готують дослідну та контрольну проби. Контрольна - живильне середовище: 0,1 % глюкози, 0,5% пептону, 0,1% K_2HPO_4 , вода водопровідна (загальний об'єм 100мл), одержану суміш розливають в пробірки по 4-5мл, стерилізують при 0,5 атм 15 хв. (або тендалізацією - тобто іншим доступним методом: 40 хв при 100 °С, потім при 37 °С добу в термостаті, знову 40 хв при 100 °С, потім добу при 37°С в термостаті), в стерильне середовище (мутність не допускається) засівають дріжджами. Культивують 7 днів при 25-30 ° С.

Дослідна - до 5 мл пивного суслу, простерилізованого аналогічно додають пивні дріжджі і культивують 7 днів в пробірці при 25-30 °С.

1. До 2 мл суспензії дріжджів додають 1 мл 10% розчину КОН, енергійно. Якщо утворився ацетоїн, починає з'являтися інтенсивне червоне забарвлення через 19-24 год .
2. До 2 мл суспензії дріжджів додають кристалик креатину, а відтак 5 мл 40% розчину NaOH, перемішуючи вміст пробірки. В присутності ацетоїну рожеве забарвлення з'являється через 2 хв.
3. До 3 мл суспензії дріжджів додають 1 мл свіжого 10% спиртового розчину β -нафтолу, 1 мл 20% розчину КОН, добре перемішують. При присутності ацетоїну відразу ж з'являється червоне забарвлення.

Примітка:

Ацетоїн (ацетилметилкарбінол) виявляють по реакції Фогес-Проскуера: в лужному середовищі ацетоїн окислюється в діацетил, який реагує з гуанідиною групою аргініну, що міститься в пептоні. Утворення комплексної сполуки виявляється виникненням червоного забарвлення.

Дослід №3 Визначення впливу кислотності середовища.

Реактиви: дріжджі хлібопекарські пресовані, солодове сусло, 0,1н оцтова кислота або 1% розчин бікарбонату натрію.

Методика визначення

Готують солодове сусло 6-8 °С. Наливають по 5 мл сусла в 4 пробірки, доводячи до рН 3, 5, 7, 9 (по рН-метру) 0,1н оцтовою кислотою або 1% розчином бікарбонату натрію). В середовище вносять піпеткою по 0,1 мл густої суспензії дріжджів. Пробірки ставлять в термостат для інкубації при 30°С протягом 3 діб. Визначають ріст дріжджів та зміну кислотності середовища.

Примітка:

Для дріжджів оптимальним є слабокисле середовище. Інтенсивність росту можна спостерігати візуально і вираховуючи кількість клітин в камері Горяєва-Тома.

Дослід №4 Плазмоліз дріжджових клітин

Реактиви: дріжджі хлібопекарські пресовані, сіль.

Методика визначення

Краплю суспензії пресованих дріжджів поміщають на предметне скло та вносять в неї декілька кристаликів солі. Через 5 хв проводять мікроскопування (збільшення 40х15). Спостерігають зміну форми клітин.

Примітка:

В плазмолізованих клітинах протоплазма відділяється від оболонки.

Дослід №5. Визначення кислотності дріжджів

Реактиви: дріжджі хлібопекарські пресовані, 0,1 н NaOH, бюретка, розчин фенолфталеїну.

Методика визначення

Наважку 10 г пресованих дріжджів розтирають в чашці, в якій міститься 50 мл дистильованої води і титрують 0,1 н розчином NaOH в присутності фенолфталеїну до появи рожевого забарвлення.

Примітка:

Кислотність в перерахунку на оцтову кислоту вираховують за формулою

$$X = 100 \cdot V \cdot k \cdot 0,06 / a , \text{ де}$$

V - об'єм 0,1н гідроксиду натрію, що пішов на титрування, мл;

k - поправочний коефіцієнт;

0,06 - маса оцтової кислоти, що відповідає 1мл 0,1н NaOH , г;

a-наважка дріжджів, г;

100- перехід, %.

Пресовані дріжджі мають слабокислу реакцію. Кислотність дріжджів прийнято виражати в мілілітрах оцтової кислоти на 100 г дріжджів. Кислотність нормальних дріжджів становить 1-2 мл 0,1н розчину NaOH, що відповідає 60-100 мл оцтової кислоти на 100 г дріжджів.

Дослід № 6. Визначення осмостійкості дріжджів

Реактиви: дріжджі хлібопекарські пресовані, мука, 3,35% розчину NaCl.

Методика визначення

Готують дві наважки дріжджів по 3,12г. Першу наважку розчиняють в 50 мл водопровідної води, нагрітої до 35°C, перемішують додають 6,5- 7,5 г муки, швидко замішують тісто, надаючи йому форму кульки, яку занурюють в циліндр з водою при 32°C і визначають час спливання кульки. До другої наважки додають 4,8 мл 3,35% розчину кухонної NaCl, нагрітої до 35°C, перемішують, замішують тісто з такою ж кількістю муки і теж визначають час спливання кульки. Визначають підйомну силу та осмостійкість.

Примітка:

Осмостійкість визначається за формулою:

$$O_c = PC - PC_c$$

$$PC = 3.5 t, \text{ де}$$

t - час спливання кульки;

PC - підйомна сила дріжджів;

PC_c - підйомна сила дріжджів з сіллю.

Дослід №7. Визначення вологості дріжджів

Реактиви: дріжджі хлібопекарські пресовані.

Методика визначення

Наважку дріжджів масою 5г висушують в бюксі 70 хв при 130°C, зваживши бюкс до та після дослідів.

Примітка:

Вологість свіжих пресованих дріжджів - 75%.

Вологість визначають за формулою (експрес метод ВНІ ІХПа)

$$X = 100 (g - g_1) / g, \text{ де}$$

g - маса наважки до висушування, г;

g₁- маса наважки після висушування г.

Дослід №8. Визначення стійкості дріжджів

Реактиви: дріжджі хлібопекарські пресовані, сіль.

Методика визначення

Дві наважки дріжджів по 5 г поміщають в тиглі, відтак один тигель поміщають в термостат, другий в холодильну камеру (контроль). Через 24 год визначають підйомну силу, порівнюючи термостатовану пробу з контрольною.

Примітка:

Для стійких дріжджів зменшення підйомної сили при несприятливій температурі має бути не вище 20 хв.

Тема 4. Технологія спирту.

Лабораторна робота №1.

Тема роботи: Аналіз сировини для біотехнологічних виробництв.

Аналіз меляси.

Сировина для біотехнологічних процесів використовується як субстрати джерела вуглецю, азоту, джерело вітамінів та мікроелементів для живлення продуцентів ферментаційних процесів. Останнім часом як сировину використовують також відходи переробних виробництв.

Аналіз крохмаловмісної сировини. Експертиза борошна

Визначення домішок до натурального борошна є актуальним оскільки з метою фальсифікації іноді до натурального пшеничного та житнього борошна підмішують борошно інших видів рослин. У зв'язку з цим виникає необхідність встановити однорідність продукту.

Таблиця 4.

	<i>Реактиви</i>	<i>Обладнання</i>
1.	розчин H_2SO_4 (2:1)	хімічний стакан
2.	концентрована HNO_3 , концентрований розчин K_2CO_3	хімічний стакан, піпетки
3.	96% C_2H_5OH , концентрована HCl	хімічний стакан, піпетки
4.		газовий пальник
5.	хлороформ, 96% C_2H_5OH , 20% розчин H_2SO_4	пробірка, пробка, піпетки
6.	0,1 н розчин $NaOH$, 1% спиртовий розчин фенолфталеїну.	колба конічна місткістю 100-150 мл, піпетка, циліндр, бюретка.
7.	стандартні буферні розчини.	ваги, лійка, фільтрувальний папір, вата, колба ,рН-метр, мірний циліндр або пробірка.

Дослід №1. Виявлення картопляного борошна.

Методика визначення

10-20 г борошна поміщають в хімічний стаканчик і додають розчин H_2SO_4 (2:1). Якщо в борошно підмішано в межах 30% картопляного борошна, то буде відчутно запах свіжих огірків.

Дослід №2. Виявлення кукурудзяного борошна.

Методика визначення

У стаканчик поміщають 3 г борошна, 1-2 мл концентрованої HNO_3 , розбавляють водою і додають 1-2 мл концентрованого розчину K_2CO_3 . При наявності кукурудзяного борошна утворюється червоний осад. Пшеничне борошно дає жовтий осад, суміш пшеничного борошна з кукурудзяним - жовтий з оранжево-червоними включеннями.

Дослід №3. Виявлення бур'янів у борошні.

Методика визначення

3 г борошна поміщають в хімічний стаканчик, додають 10 мл 96% C_2H_5OH і 0,5 мл концентрованої HCl . У пробі чистого житнього та пшеничного борошна спирт залишається безбарвним, вівсяна і ячмінна мука дають жовто-солом'яне забарвлення. При наявності більше 5% бур'янистих насінин (насіння жита дає інтенсивно-червоний колір, кукіль оранжево-жовтий, вика - рожево-червоний).

Дослід №4. Виявлення покращувачів у борошні.

Методика визначення

Якщо при внесенні не великої кількості борошна в полум'я (просипанні борошна крізь полум'я) спостерігається горіння зразка із утворенням смолянистого залишку або ж борошно іскритиме – це є свідченням присутності покращувачів, відбілювачів (йодату калію (KJO_3), перекису кальцію (CaO_2) або інших солей).

Дослід №5. Виявлення шкідливих домішок (споринь).

Споринья, маткові ріжки - гриб, що паразитує на злакових, головним чином, на житі та пшениці.

Методика визначення

У чисту суху пробірку поміщають 1 г борошна, доливають 6-8 мл хлороформу, пробірку закривають пробкою, вміст добре збовтують і відстоюють 30 хв. Пісок, мінеральні домішки і кукіль у вигляді чорних частинок осідають на дно пробірки. Ріжки разом з частинками насіння рослин і висівками залишається на поверхні. Потім у пробірку додають 3-4 мл 96% етилового спирту і вміст знову перемішують. Частинки насіння бур'янів разом з висівками опускаються на дно, а ріжки залишаються на поверхні рідини. Після додавання в вміст пробірки трьох крапель 20% розчину H_2SO_4 чорні частки ріжків облямовуються рожево-фіолетовим кільцем.

Дослід №6. Визначення титрованої кислотності борошна титруванням з індикатором.

Кислотність борошна - важливий показник якості, що свідчить про його свіжість. Кислотність борошна зумовлена присутністю білків, що мають кислу реакцію, наявністю вільних жирних кислот і різних з'єднань фосфорної кислоти. Крім того, в борошні в невеликій кількості містяться такі органічні кислоти, як яблучна, оцтова, молочна та ін.

При зберіганні борошна кислотність його підвищується, що пов'язано в першу чергу з гідролітичними процесами, що відбуваються з високомолекулярними сполуками борошна. Жири, що містяться в борошні розщеплюються під дією ферменту ліпази на вільні жирні кислоти і гліцерин, під дією протеолітичних ферментів йде гідроліз білків з утворенням амінокислот, а при розпаді фосфатидів утворюються кислі фосфати. Зберігання борошна при підвищеній температурі і вологості веде до прискорення цих процесів через зростання активності ферментів борошна.

Крім того, несприятливі умови зберігання борошна активізують життєдіяльність бактерій, за рахунок чого в борошні зростає кількість органічних кислот.

Таким чином, борошно з високою кислотністю або зберігалось тривалий час, або зберігалось в несприятливих умовах, або отримане з зерна зі зниженими хлібопекарськими властивостями.

Методика визначення

З випробуваної проби беруть наважку борошна масою 5 г (купи попередньо розтирають у ступці) з похибкою не більше 0,01 г, переносять її в суху конічну колбу місткістю 100-150 мл і доливають циліндром 50 мл дистильованої води. Вміст колби перемішують до зникнення грудок борошна і додають 5 крапель 1% розчину фенолфталеїну, а в бовтанку з житнього борошна - 8 крапель індикатора. Потім бовтанку титрують 0,1 н розчином NaOH до появи ясного рожевого забарвлення, яке не зникає при спокійному стоянні колби протягом 20-30 с.

При зникненні рожевого забарвлення після закінчення зазначеного часу додають ще 5-6 крапель розчину фенолфталеїну. Поява рожевого забарвлення свідчить про закінчення титрування. В іншому випадку титрування продовжують.

Якщо вихідна бовтанка інтенсивно забарвлена, то для порівняння готують іншу бовтанку з випробуваної проби борошна і при титруванні постійно порівнюють отриманий відтінок з початковим кольором бовтанки.

Розрахунки

Кислотність борошна X в градусах кислотності обчислюють за формулою:

$$X = \frac{V \cdot 100}{m \cdot 10},$$

де V - кількість 0,1 н розчину NaOH, який пішов на титрування, мл;

m - маса наважки борошна, г;

1/10 - коефіцієнт перерахунку 0,1 н. розчину NaOH на 1 н;

100 - перерахунок на 100 г продукту.

Примітка

Показник титрованої кислотності не повинен перевищувати для пшеничного борошна вищого сорту 3°Т, для борошна І сорту - 3,5°Т, для борошна ІІ сорту - 4,5°Т, для житнього сіяного борошна - 4°Т, для обдирного - 5°Т, шпалерного - 5,5°Т. Кислотність круп різних видів не повинна перевищувати 5°Т. Кислотність крохмалю картопляного повинна бути не більше 20°Т, а кукурудзяного - не більше 25°Т.

Дослід №7. Визначення активної кислотності борошна.

Методика визначення

Встановлений прилад включають в мережу, перевіряють по стандартному буферному розчину. Електрод перед зануренням в досліджуваний розчин промивають дистильованою водою і витирають фільтрувальним папером. Після чого вимірюють рН досліджуваного фільтрату.

Для отримання витяжки беруть наважку борошна масою 10 г, додають 100 мл гарячої дистильованої води і нагрівають до кипіння для інактивації ферментів. Настоюють протягом години, перемішують, дають відстоятися і обережно фільтрують надосадову рідину. Для визначення відбирають від 20-30 мл фільтрату, поміщають в пробірку з конічним дном або стаканчик і вимірюють на приладі рН.

Примітка

Розрізняють титровану кислотність (загальну) і активну (рН). Титрована кислотність характеризує загальна кількість вільних кислот і кислих солей. Її прийнято виражати в градусах. Під градусом кислотності розуміють кількість 1 н розчину NaOH, що витрачається для нейтралізації кислот і кислих солей, що містяться в 100 г борошна.

Як правило, борошно має активну кислотність 5,8-6,3. Така вузька межа зміни рН борошна пов'язана з великою буферною здатністю білкових речовин і фосфатів. М'яса основна сировина (50% всіх типів), яка містить основний субстрат сахарозу, як джерело вуглецю, а також містить амінокислоти як джерело азоту, містить багато вітамінів, зокрема біотин тощо.

Лабораторна робота № 2.

Тема роботи: «Аналіз культуральної рідини на вміст цукрів (спирт, пиво тощо)»

Культуральна рідина – рідина, що містить біомасу відпрацьованого продуцента та продукти біосинтезу, біотрансформації чи метаболіти інших біопроцесів.

Дослід №1. Визначення інвертного цукру методом прямого титрування (метод Лейні і Ейнона).

Метод заснований на титруванні встановленого обсягу окислювача - розчину Фелінга відомої концентрації (з певним титром по цукру) розчином, що містить невідому кількість цукру, до повного відновлення оксиду купруму. За кількістю розчину, що містить цукор, який пішов на відновлення купруму, обчислюють кількість інвертного цукру в досліджуваній рідині. Метод рекомендований для визначення інвертного цукру в виноградних і плодово-ягідних винах.

Реактиви: свіжоприготовлений реактив Фелінга, складається із двох розчинів: № 1 і № 2; 1% розчин метиленового блакитного; 20% розчин HCl; 20% розчин NaOH; 1% розчин фенолфталеїну, стандартний розчин інвертного цукру.

Обладнання: конічні колби, бюретки місткістю; піпетки, нагрівальний прилад, термометр.

Методика визначення

Приготування стандартного розчину інвертного цукру: із сухої цукрової пудри беруть наважку близько 0,3 г, кількісно переносять у мірну колбу об'ємом 250 мл і вносять 100 мл дистильованої води. Після повного розчинення сахарози додають 10 мл 20% розчину HCl. Інверсію цукру до

моноцукрів здійснюють на водяній бані, попередньо нагрітої до 80-85°C і підтримують її протягом 5 хв, після чого рідину охолоджують до 20°C.

Отриманим стандартним розчином інвертного цукру встановлюють титр робочого розчину, застосовуючи свіжоприготовлений реактив Фелінга.

Стандартним розчином інвертного цукру заповнюють бюретку, а в конічну колбу вносять по 5 мл точно відміряного розчину Фелінга № 1 і № 2. Безпосередньо в момент використання змішують рівні об'єми № 1 і № 2 розчинів Фелінга. До розчину Фелінга з бюретки доливають 20 мл стандартного розчину інвертного цукру. Суміш збовтують, доводять до кипіння і кип'ятять протягом 2 хв, після чого додають 2-3 краплі розчину метиленового блакитного

Наприкінці другої хвилини кипіння доливають три краплі індикатора (метиленового синього) й спостерігають за кольором розчину. Якщо колір розчину не зникає, не припиняючи кипіння, дотитровують досліджуванним розчином до зникнення синього кольору. Після зникнення синього кольору (при цьому інколи осад стає червоним з помаранчевим відтінком) відмічають об'єм розчину, який пішов на титрування.

Титр робочого розчину Фелінга в грамах інвертного цукру (U) обчислюють за формулою:

$$U = \frac{Y - Z - 1,0526}{100}$$

де Y - кількість стандартного розчину інвертного цукру, який пішов на титрування робочого розчину Фелінга, мл;

Z - наважка сахарози, г;

1,0526 - коефіцієнт перерахунку на інвертний цукор (за інверсії 1 г сахарози утворюється 1,0526 г інвертного цукру);

100 - об'єм дистильованої води, в якій розчинялася сахароза, мл.

У тому випадку, коли вміст цукру визначають у перерахунку на сахарозу, коефіцієнт 1,0526 з формули слід вилучити.

Приготування досліджуваного розчину: 25 мл культуральної рідини (або рідка опара, пивне сусло, спиртове сусло, вино) розбавляють дистильованою водою до об'єму 100 мл. Розчин ретельно перемішують і відбирають 25 мл у мірну колбу ємністю 100 мл, туди ж додають 5 мл 20% розчину HCl. Переносять колбу в водяну баню, попередньо нагріту до 80-85°C і підтримують температуру протягом 5 хв, після чого протягом 2-3 хв під струменем води охолоджують рідину в колбі до температури 20°C. По краплях додають 20% розчину NaOH в присутності 1-2 крапель 1%-го розчину фенолфталеїну доводячи рН середовища в колбі до слабо лужного (слабо рожеве забарвлення).

Дослід №2. Визначення інвертного цукру у вині.

У конічну колбу ємністю 50 або 100 мл відміряють по 5 мл розчинів Фелінга № 1 і № 2 і доводять до кипіння. З бюретки поступово, не припиняючи кипіння, доливають в колбу досліджуваний розчин до тих пір, поки синій колір киплячої суміші не зникне повністю. Після цього додають 2-3 краплі 1% розчину метиленового блакитного і, не припиняючи кипіння,

продовжують доливати досліджуваний розчин по краплях, поки синій колір суміші не перейде в червоний або оранжевий. Тривалість кипіння рідини в колбі протягом усього титрування не повинна перевищувати 3 хв.

Розрахунки

Вміст інвертного цукру у вині (X) у відсотках обчислюють за такою формулою:

$$X = \frac{U - 100 - A}{S}$$

де U - титр реактиву Фелінга;

A - фактор розведення випробуваного розчину;

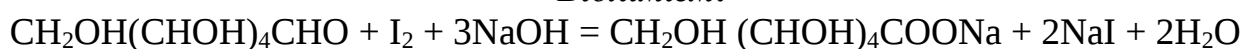
S - кількість досліджуваного розчину, який пішов на титрування, мл.

Таблиця 5.

Класи вин	Цукристість, %	Класи вин	Цукристість, %
столові сухі	0,3	портвейн	17 – 19
напівсухі	0,3 - 3	шампанське брют	0,5 – 1,5
напівсолодкі	10 – 14	шампанське сухе	3,5
десертні міцні	3 – 13	шампанське напівсухе	5
десертні легкі	10 – 20	шампанське напівсолодке	8
десертні ароматизовані	5 – 35	шампанське солодке	10

Дослід №3. Визначення глюкози в сухих винах.

Біохімізм:



Реактиви: 0,1 н розчин I_2 , 0,1 н розчин NaOH , 0,1 н $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 0,1 н H_2SO_4 , 0,5% розчин крохмалю.

Обладнання: бюретка, піпетки, конічна колба для титрування з притертою пробкою місткістю 250 мл, мірний циліндр місткістю 50 мл, лійка.

Методика визначення

10 мл аналізованого вина, поміщають в конічну колбу і додають 25 мл розчину I_2 . При безперервному перемішуванні розчину доливають 30 мл розчину NaOH . Колбу закривають скляною пробкою, поміщають в затемнене місце на 15 хвилин, потім підкисляють 35 мл розчину H_2SO_4 . Титрують розчином $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ до слабо-жовтого забарвлення. При додаванні крохмалю розчин набуває синього кольору. Продовжують титрування до знебарвлення розчину.

Розрахунки

Вміст глюкози у вині X (г/100 мл) розраховують за формулою:

$$X = 0,009 \cdot \frac{V_1 - V_2}{10} \cdot 100$$

де 0,009 - маса глюкози, що відповідає 1 мл розчину йоду з концентрацією еквівалента 0,1 моль/л;

V_1 - об'єм розчину йоду, мл;

V_2 - об'єм розчину тіосульфату, витрачений на титрування, мл;

V_n - обсяг проби вина, мл.

Примітка

Вуглеводи вина представлені в основному глюкозою й фруктозою, їх зміст: в сухих винах - до 0,3%, в напівсухих - до 3%, в напівсолодких - до 8%, в солодких - до 20%. В сухих винах цукристість представлена в основному глюкозою.

Глюкоза, фруктоза, завжди присутні в молодих винах, зникають паралельно під час бродіння, глюкоза витрачається швидше, ніж інші цукри. Саме за рахунок цих залишкових цукрів у винах розмножуються бактерії, котрі здійснюють повторне бродіння вина.

Лабораторна робота № 3.

Тема роботи: Ферментаційне одержання спирту з меляси.

(Заводський метод.)

Реактиви: буряковоцукрова патока (меляса), суспензія дріжджів роду *Saccharomyces cerevisiae* осмофільної раси В, гібридних рас Г-67, Г-73, Г-75, Г-112.

Обладнання: для приготування бродильного середовища та проведення бродіння: колба об'ємом 2 л з'єднана з водяним вловлювачем через корок з газовідвідною трубкою, конічні колби, мірний посуд, шпателі та ін.

Для перегонки: установка для перегонки при нормальному тиску.

Для ректифікації: перегінна колонна, обов'язково забезпечена піщаною банею для нагріву куба з бражкою.

Методика визначення

1. Приготування м'ясного сусла.

В конічну колбу завантажують 100 г меляси, визначають рН за допомогою універсального індикаторного папірця, розбавляють водою в співвідношенні 1:1 та освітлюють вакуумною фільтрацією. Осад видаляють, фільтрат переносимо в колбу для бродіння, де проводимо пастеризацію нагріванням до температури 85-95°C та витримкою при цій температурі 50-60 хв. По закінченні для проведення антисептичної обробки підкислюють сірчаною кислотою до слабокислої реакції (1,2-2,2"), для додаткової антисептичної обробки меляси з високим вмістом шкідливої мікрофлори додають розчин хлорного вапна (1:5) з розрахунку 1,5 кг на 1 т розчину патоки та витримують 2 год. Після чого для підживлення додають карбамід та сульфат амонію та готують сусло концентрацією 20-22% сухої речовини додаванням очищеної води.

2. Внесення культури дріжджів та проведення процесу бродіння.

Сусло підігрівають до температури 24-30°C та додають суспензію дріжджів в кількості 3-5% загального об'єму.

Бродіння проводять при температурі 28-30°C протягом 72 год. Бродіння вважається закінченим при припиненні виділення бульбашок газу.

Температура бродіння визначається термометром систематично, не рідше двох разів на добу.

Спостереження за протіканням процесу бродіння вносимо в журнал

спостережень.

При занесенні в журнал спостережень обов'язково зазначається, хто саме проводив відбір та дослідження проби.

Вміст незброджених розчинних вуглеводів в зрілій бражці не більше 8,5-9,0 % об., кислотність не перевищує 0,4-0,5°Т.

3. Перегонка браги.

Перегонку проводимо при нормальному тиску в стандартній установці для перегонки, що складається з перегінної колби, насадки з термометром, зворотного холодильника, алонжа та колби - приймача. Нагрівання проводимо на відкритому полум'ї або на піщаній бані. Температура парів не вище 94 °С. Визначаємо очікувану міцність відгону з діаграми на рис. 1, виходячи із середнього значення температури парів при перегонці. Перевіряємо це значення за допомогою спиртометра.

Визначаємо об'ємний вихід спирту. В нормі він має складати 10% об.

Перевіряємо за допомогою спиртометра міцність відгону.

Винос спирту залежить від концентрації спирту в бражці та її температури. Середня величина виносу спирту при періодичному бродінні дорівнює приблизно 0,8% від загальної його кількості. Перевіряємо вміст спирту в промивній воді з вловлювача за допомогою спиртометра.

4. Ректифікація.

Для виділення спиртової фракції використовуємо розділення технічного відгону на лабораторній ректифікаційній колонці, яка складається з круглодонної колби (кубу), дефлегматора, головки повної конденсації, зворотного холодильника, термометра, прямого холодильника, алонжа та колби приймача.

Нагрівання проводимо виключно за допомогою піщаної бані.

Відділяємо фракцію, що кипить при температурі 78-79 °С.

Визначаємо об'єм та міцність одержаного ректифікату.

Розраховуємо об'ємний та масовий вихід чистого спирту.

Лабораторна робота № 4.

Тема роботи: Одержання спирту із зернового помелу (заводський спосіб).

Реактиви: зерновий помел (ячмінь, просо, овес), розріджуючі та оцукрюючі ферментні препарати, суспензія дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* XII раси, вода очищена.

Обладнання: для приготування солодкого затору та проведення процесу бродіння: скляний бутель об'ємом 13 л. з'єднаний з водяним вловлювачем через корок з газовідвідною трубкою, конічні колби, мірний посуд, шпателі, лійки, термостат, млинок для подрібнення солоду та ін.

Для перегонки: установка для перегонки при нормальному тиску.

Для ректифікації: перегінна колонна, обов'язково забезпечена піщаною банею для нагріву куба з бражкою.

Методика визначення

1. Приготування солодкого затору.

Подрібнене зерно (величина частинок 250 нм) змішуємо з попередньо нагрітою до 30°C водою і при постійному перемішуванні додаємо ферментні препарати, після чого суміш нагріваємо до температури розрідження: при застосуванні ферменту Термаміп до 90-95°C, при застосуванні ферменту Бан - до 70-75°C. Масу з розріджуючим ферментом витримуємо при заданій температурі та інтенсивному перемішуванні протягом 3-х годин.

Одерясане сусло при застосуванні ферменту Термаміп не пастеризуємо, а при використанні ферменту Бан прогріваємо до 95°C протягом 5 хв. і починаємо охолодження. При температурі 85°C додаємо для азотного живлення 10 г карбаміду. Охолоджуємо до температури 50°C, після чого в сусло додаємо 5 мл сульфатної кислоти для знищення молочнокислих бактерій і додатково для фосфорного живлення 5 мл фосфатної кислоти.

Сусло охолоджуємо до температури складки 18-20°C. При температурі 57-58°C в бутель додаємо фермент San Super для оцукрювання і витримуємо 2 год.

Визначаємо відносну густину сусла (див. поп. лаб. роб.).

2. Внесення культури дріжджів та проведення процесу бродіння. Приймаємо, що в борошні 60% зароджуваних цукрів, а також, що для бродіння 8 кг цукру іде 1 кг дріжджів.

Тоді на 2,5 кг борошна необхідно 100 г дріжджів.

Проводимо мікробіологічний контроль якості вихідних дріжджів. У підготовлених дріжджах допускається наявність мертвих клітин не більше 3%, наявність сторонніх бактерій 1-2 палички.

Дріжджі вводимо у вигляді суспензії в об'ємі не більше ніж 10 % сусла.

Дріжджі вносимо в бугель з бродильним середовищем при температурі 30°C.

Як піногасник додаємо декілька крапель олії.

Бродіння проходить при температурі 28 - 30°C протягом 72 год.

При бродінні утворюється велика кількість вуглекислого газу, який, піднімаючись у вигляді бульбашок через шар бражки, насичується парами спирту. Винос спирту залежить від концентрації спирту в бражці та її температури. Середня величина виносу спирту при періодичному бродінні дорівнює 0,8% від загальної його кількості. Щоб виключити втрати, спирт вловлюють за допомогою вловлювачів.

Перевіряємо кислотність дріжджового затору. Кислотність визначаємо за допомогою універсального індикаторного папірця (в нормі рН=4,0-4,5).

Температуру бродіння визначаємо термометром систематично, не рідше двох разів на добу.

Нерозчинний крохмаль визначається в зрілій бражці.

Спостереження за протіканням процесу бродіння вносимо в журнал спостережень. При занесенні в журнал спостережень обов'язково зазначаємо, хто саме проводив відбір та дослідження проби.

4. Перегонка браги.

Перегонку проводимо при нормальному тиску в стандартній установці для перегонки, що складається з перегінної колби, насадки з термометром, зворотного холодильника, алонжа та колби - приймача. Нагрівання проводимо

на відкритому полум'ї або на піщаній бані. Температура парів не вище 94 °С.

Визначаємо очікувану міцність відгону з діаграми на рис. 1, виходячи із середнього значення температури парів при перегонці. Перевіряємо це значення за допомогою спиртометра.

Визначаємо об'ємний вихід спирту. В нормі він має складати 10% об.

Перевіряємо за допомогою спиртометра міцність відгону.

Винос спирту залежить від концентрації спирту в бражці та її температури. Середня величина виносу спирту при періодичному бродінні дорівнює приблизно 0,8% від загальної його кількості. Перевіряємо вміст спирту в промивній воді з вловлювача за допомогою спиртометру.

5. Ректифікація.

Для виділення спиртової фракції використовуємо розділення технічного відгону на лабораторній ректифікаційній колонці, яка складається з круглодонної колби (кубу), дефлегматора, головки повної конденсації, зворотного холодильника, термометра, прямого холодильника, алонжа та колби приймача.

Нагрівання проводимо виключно за допомогою піщаної бані.

Відділяємо фракцію, що кипить при температурі 78-79 °С.

Визначаємо об'єм та міцність одержаного ректифікату.

Розраховуємо об'ємний та масовий вихід чистого спирту.

Лабораторна робота № 5.

Тема роботи: Визначення масової частки спирту у вині, пиві та інших алкогольних напоях.

Метод базується на визначенні вмісту етилового спирту в дистиляті, одержаному після перегонки продуктів за допомогою спиртометра.

Матеріали: зразки напоїв: вино, пиво та ін..

Обладнання: мірна колба місткістю 250 мл, круглодонна колба для перегонки об'ємом 250 мл, прямооточний або кульковий охолодник, спиртомір побутовий, циліндр об'ємом 100 мл, пробірка, термометр з ціною поділки 0,2°С, електроплита.

Методика визначення

Вносять 100 мл алкогольного напою за температури 20°С з мірного циліндра в перегінну колбу. Мірний циліндр ополіскують 20 мл дистильованої води, зливаючи промивну воду у перегінну колбу. Досліджуваній зразок нейтралізують 1 моль/л розчином NaOH за допомогою індикаторного паперу. Після цього перегінну колбу із досліджуванним розчином поміщають в ємність із моторним маслом, котра знаходиться на електроплиті. В колбу поміщають декілька дрібних керамічних тіл (при нагріванні рідини вони збирають бульбашки повітря і стають центрами кипіння чим забезпечують його рівномірність і відсутність поштовхів) і колбу з'єднують із холодильником та термометром. Кінець холодильника з'єднують із приймальною колбою. До холодильника підводять холодну воду.

Перегонку завершують, коли в приймальній колбі збереться близько 50-75 мл дистиляту. Дистилят охолоджують до температури 20°С, яку вимірюють термометром.

Техніка аналізу

Щоб визначити міцність дистиляту алкогольного напою скляним спиртомір, беруть скляний циліндр або пробірку такого діаметра, щоб спиртомір вільно опускався в рідину, не торкаючись стінок посудини.

В посудину наливають аналізований дистилят. Щоб прискорити вилучення бульбашок повітря вміст перемішують. Після повного вилучення всіх бульбашок в посудину обережно опускають спиртомір, тримаючи його за верхній стрижень великим і вказівним пальцями і не торкаючись руками частини, що занурилась. Витримуючи в рідині спиртомір 3-5 хв, одночасно відраховують величину занурення спиртоміра за нижнім меніском і покази термометра. При цьому око має розміщуватись трохи нижче від рівня рідини. В такому положенні більш чітко видно лінію перетину рівня рідини із шкалою.

Тема 5. Біотехнологічні аспекти пивоваріння

Лабораторна робота №1.

Тема роботи: «Дослідження культур дріжджів, що використовуються в пивоварінні. Вивчення класичних технологій пивоваріння».

Пивні дріжджі відносяться до двох видів: *Saccharomyces cerevisiae* та *Saccharomyces carlsbergensis*. Дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* є дріжджами верхового бродіння і в пивоварінні використовуються рідко, в основному для темних і спеціальних сортів пива. Ці дріжджі у виробничих умовах зброджують сусло при 12-15°C.

Дріжджі *Saccharomyces carlsbergensis* відносяться до дріжджів низового бродіння та у виробництві здійснюють головне бродіння при 5- 10°C. Вони знайшли широке застосування в пивоварному виробництві і використовуються для приготування стандартного і сортового пива.

Вимоги, що пред'являються до пивних дріжджів. Основні вимоги, що пред'являються до рас дріжджів при виробництві спирту є:

- Повинні мати високу бродильну активність. Бродильна активність визначається ступенем зброджування сусла, тобто відношенням маси забродженого екстракту до маси сухих речовин (СР) в початковому суслі;
- Повинні володіти флокуляційною здатністю, тобто здатністю повільно та повно осідати на дно бродильних апаратів в кінці головного бродіння;
- Повинні мати помірну здатність до розмноження. Дуже активне розмноження дріжджів небажано, тому при цьому витрачаються екстрактивні речовини сусла і утворюється велика кількість побічних продуктів. У середньому в процесі бродіння біомаса дріжджів збільшується в 3 ... 4 рази;
- Повинні бути стійкими до несприятливих умов і інфікуванню;
- Повинні володіти стійкістю морфологічних і фізіологічних властивостей;
- Повинні надавати пиву характерний смак і аромат.

Спиртові дріжджі. У спиртовому виробництві застосовують дріжджі виду *Saccharomyces cerevisiae*, які повинні мати наступні властивості:

- Висока бродильна активність. Спиртові дріжджі повинні утворювати максимум спирту;

- Здатність зброджувати як моноцукри, так і дисахариди і деякі декстрини;
- Здатність зброджувати розчини, що містять досить великі концентрації цукру;
- Висока кислотостійкість;
- Здатність здійснювати спиртове бродіння при високому вмісті спирту в розчині.

Виробництво пива складається з наступних етапів:

1. Підготовка солоду - солод провіюють і подрібнюють.
2. Затирання суслу - подрібнений солод змішується з водою. При затиранні крохмаль у зернах розщеплюється до цукру, мальтози і розчинних речовин декстринів. Сусло при цьому набуває солодкуватий смак. Затор - суміш подрібнених зернопродуктів, призначених для затирання, з водою.
3. Фільтрація затору - затор перекачується у фільтр - чан, де відбувається його поділ на неохмелене сусло і дробину. Дробина - нерозчинні залишки ячменю, одержувані в процесі фільтрації затору.
4. Кип'ятіння суслу - сусло з додаванням хмелю а також інших інгредієнтів вариться 1-2 години. Під час кип'ятіння хміль розчиняється, білкові речовини коагулюють і випадають в осад. Крім того, випаровується різні ароматичні компоненти, що несприятливо впливають на смак пива.
5. Освітлення суслу - сусло перекачують у гідроциклон (Вірпул) для відділення нерозчинних залишків ячменю і хмелю. Ці частинки, під дією відцентрової сили, збираються по радіусу гідроциклона. Після 20-30 хвилин відстоювання сусло відділяють від нерозчинного залишку.
6. Охолодження і аерація суслу - сусло перекачується в бродильний танк. Протягом перекачування воно охолоджується і насичується киснем, необхідним для харчування дріжджів.
7. Бродіння - в отриманий розчин додаються пивні дріжджі, і він зброджується при низьких температурах кілька тижнів. Пиво стає насиченим пивними дріжджами (мікроорганізмами), корисними мікро-та макроелементами, в ній дуже високий вміст вітаміну РР. Через це живе пиво завжди має осад на дні.
8. Дозрівання пива.
9. Фільтрація - пиво фільтрується від залишків дріжджів. Фільтроване пиво відрізняється тим, що воно більш стабільне, і може зберігатися до 2-х тижнів.
10. Пастеризація - деякі сорти пива піддаються пастеризації – нагрівання до температури 68-72 °С, для збільшення терміну зберігання. Таке пиво зберігається до 6-ти місяців.

Лабораторна робота №2.

Оцінка якості пива.

Дослід №1. Визначення якості пива за мікробіологічними показниками.

Реактиви: пиво пастеризоване у пляшках, залізних банках, розливне, стерильний посуд для посіву й селективні середовища.

Методика визначення

1. Відібрати середню пробу пива.
2. Зробити посіви на всі мікробіологічні показники.
3. На наступному занятті підрахувати число колоній, що вирости, перерахувати на 1 см³ продукту.
4. Результати занести в таблицю. Порівняти отримані результати з нормативними показниками, зробити висновок про якість безалкогольних напоїв.

Таблиця 6.

Мікробіологічні показники пива							
Найменування продукту	КМАФАМ, КУО/см ³ , не більше		Об'єм продукту, см ³ , в якому не допускається				Висновки
			БГКП		патогенні мікроорганізми, у тому числі сальмонели		
	нор- матив	результат	нор- матив	результат	нор- матив	результат	
Пиво пастеризоване в пляшках, металевих банках та інших видах споживчої тари	5·10 ²		10		25		
Пиво пастеризоване в пляшках з масовою часткою сухих речовин:							
8 - 11,5 %	—		3		25		
12 - 20 %	—		10		25		
Пиво розливне фільтроване та нефільтроване	—		1		25		

5. Підписати основні апарати в класичній технології пивоваріння (рис. 2).

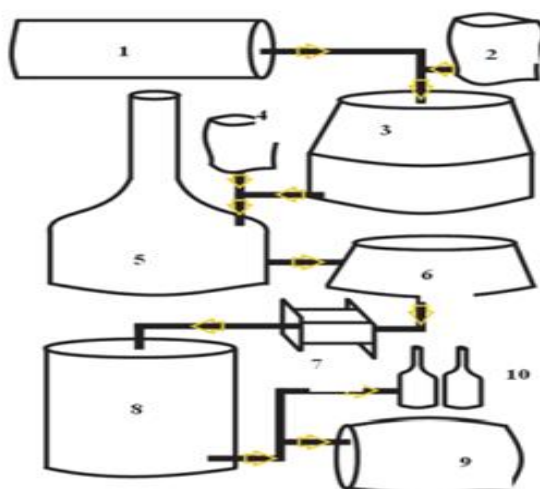


Рис. 2. Основні апарати у класичній технології пивоваріння

Дослід № 2. Визначення якості пива.

Метод заснований на візуальному порівнянні інтенсивності забарвлення дослідного пива з кольором розчину йоду різної концентрації.

Реактиви: прилади і реактиви: колба з пробкою місткістю 500 см³, струшувальний апарат, фільтрувальний папір, мірний циліндр, мірні стакани, бюретка, дистильована вода, розчин йоду, пиво різних сортів

Методика визначення

Пиво об'ємом 150...200 см³ наливають в колбу ємністю 500 см³, закривають пробкою з одним отвором та струшують на апараті для струшування протягом 20...30 хв.

Допускається струшування вручну. Колбу з пивом струшують, закриваючи долонею, періодично відкриваючи її, доти, поки не припиниться відчуття тиску зсередини.

Непрозоре пиво фільтрують крізь паперовий фільтр. Темне пиво розводять у мірному циліндрі водою у співвідношенні 1:3.

До однієї склянки відміряють пиво об'ємом 100 см³ а в іншу – дистильовану воду об'ємом 100 см³. У склянку з водою приливають з бюретки, при перемішуванні, розчин йоду доти, поки колір розчину, що утворюється, не стане однаковим з кольором пива в іншому стакані.

Колір пива виражається кількістю см³ 0,1 моль/дм³ розчину йоду на 100 см³ води.

Дослід № 3. Визначення кислотності пива.

Метод заснований на титруванні всіх кислот та кислих солей, які знаходяться в пиві, 0,1 н розчином гідроокису натрію в присутності червоного фенолфталеїну або спиртового розчину фенолфталеїну.

Реактиви: колба з пробкою місткістю 500 см³ термостійка, конічна колба, мірний циліндр, струшувальний апарат, фільтрувальний папір, електрична (газова) плитка, дистильована вода, 0,1 н розчин гідроокису натрію, біла фарфорова пластина, червоний фенолфталеїн, спиртовий розчин фенолфталеїну, пиво різних сортів.

Методика визначення

Пробу додатково звільняють від залишків двоокису вуглецю, нагріваючи до 40°C і витримуючи при цій температурі 30 хв, періодично струшують. Пиво охолоджують до 20 °C. Непрозоре пиво попередньо фільтрують крізь паперовий фільтр. Темне пиво з кольором вище 3,0 см³ 0,1 н розчину йоду на 100 см³ води перед визначенням кислотності розводять дистильованою водою у співвідношенні 1:1.

Визначення титрованої кислотності із використанням спиртового розчину фенолфталеїну як *індикатора*: від отриманого лабораторного зразку пива відбирають пробу об'ємом 50 см³. Пробу переносять у колбу для титрування, додають 3...7 крапель спиртового розчину фенолфталеїну і титрують із бюретки розчином гідроксиду натрію концентрацією 0,1 моль/дм³. Титрування здійснюють при постійному перемішуванні і доливанні розчину NaOH до появи блідо-рожевого забарвлення, що не зникає протягом 30 с.

Визначення титрованої кислотності із використанням червоного фенолфталеїну як індикатора: розчин червоного фенолфталеїну готують безпосередньо перед аналізуванням. До 20 см³ дистильованої води додають 10 крапель спиртового розчину фенолфталеїну і 3 краплі розчину їдкого натрію молярною концентрацією 0,1 моль/дм³. Після підготування індикатора готують пробу для визначення. Для цього в конічну колбу набирають 50 мл лабораторного зразку пива і титрують 0,1 н розчином гідроксиду натрію до тих пір, поки 4 краплини, що перенесені з колби на фарфорову пластинку, при змішуванні з 2 краплями червоного фенолфталеїну не перестануть його знебарвлювати.

Опрацювання результатів

Кислотність пива розраховують за тою ж формулою:

$$K_{л.с.} = \frac{V \times 2}{10} \times k$$

V – об'єм розчину гідроксиду натрію, що пішов на титрування, см³; 2 – коефіцієнт переведення на об'єм 100 см³ сусла; k – коефіцієнт поправки робочого розчину гідроксиду натрію.

За кінцевий результат випробовування приймають середнє арифметичне результатів двох паралельних визначень і округлюють його до другого десяткового знаку. Результат виражають цілим числом з одним десятковим знаком.

Якщо перед визначенням пиво було розбавлено дистильованою водою у співвідношенні 1:1, отриманий результат помножують на 2.

Дослід № 4. Визначення білкової стійкості пива.

Поява муті небіологічного характеру в готовому пиві пояснюється недостатньою стійкістю деяких гідрофільних колоїдів (білкових і дубильних речовин, меланоїдинів), які під дією різних факторів коагулюються. Спочатку колоїдні частинки збільшуються, проте ця їх зміна залишається непомітною для ока. Потім вони на стільки зростають, що починають відбивати промені світла, стають оптично видними і в пиві з'являється опалесценція. Нарешті частинки на стільки зростають, що стають помітними, пиво мутнішає. На швидкість появи колоїдних помутнінь має вплив температура, рН, світло, механічна дія, присутність солей, слідів металів (олова, міді, заліза) та ін. фактори.

Колоїдні помутніння, в яких головну роль відіграють білкові помутніння, поділяються на 2 види:

1. *Холодне помутніння* – виникає із зниженням температури. Характеристика: після певного зберігання пива в льоді воно стає менш прозорим незважаючи на те, що при звичайних температурах його прозорість відповідає нормам. - зворотне – зникає при підігріванні і знову з'являється при охолодженні; - незворотне – не зникає при підігріванні. Перетворюється із зворотного під дією кисню повітря, світла, металів.

2. *Окислювальне помутніння* – з'являється після тривалого зберігання пива і не зникає при нагріванні.

Холодна муть і муть окислювання складаються переважно із 40...80% білка, 17...35% дубильних речовин, 4...13% вуглеводів та 1...3% мінеральних речовин. Проте суть процесів, що призводять до помутнінь пива, полягає не лише у вмісті індивідуальних речовин, але й в утворенні комплексних з'єднань (глюкопротеїнів, білково-дубильних, антоціаногенобілкових комплексів), які за своїми властивостями значно відрізняються від речовин, що входять до їх складу. Так, комплекс, що утворюється при з'єднанні білків і танінів, легко випадає в осад при зниженні температури і окисленні. Це пов'язано із тим, що таніни солоду і хмелю характеризуються меншою гідрофільністю, ніж білки.

Щоб виявити схильність того чи ін. пива до таких помутнінь, його піддають тепловим і механічним діям, тобто прагнуть штучно викликати в ньому помутніння для того, щоб зробити цінний для виробництва висновок про очікувану білкову стабільність дослідного пива.

Реактиви: колби або склянки на 25...30 см³, насичений розчин сірчаноокислого амонію (45 г (NH₄)₂SO₄ розчиняють в 50...60 мл дистильованої води і відфільтровують).

Холодна муть – час, протягом якого пиво, розміщене в льоді, що тоне, при 0°C, зберігає повну прозорість.

Межа осадження – характеризується кількістю насиченого розчину сірчаноокислого амонію в мл, що необхідно додати до 100 мл дослідного пива, щоб викликати в ньому помутніння. При додаванні сірчаноокислого амонію до пива відбувається відщеплення гідратаційної вологи від білкових молекул, в результаті чого вони з'єднуються, утворюючи пластівці, і виникає помутніння.

Методика визначення

В ряд склянок наливають по 10 мл пива, що попередньо звільнене від вуглекислого газу. Потім в пронумеровані склянки послідовно, в зростаючій на 0,1 мл кількості, додають насичений розчин сірчаноокислого амонію: 0,5; 0,6; 0,7...; 1,0; 1,1; 1,2; 1,3 та 1,4 мл. Вміст склянок перемішують і залишають за температури 20 °C на 15 хв. Після цього відмічають склянку, в якій відбулося помутніння.

Опрацювання результатів

Показник межі осадження розраховують за формулою:

$$MO = V \times 10$$

де V – об'єм сірчаноокислого амонію, що міститься в склянці, в якій відбулося помутніння, мл.

Чим більша межа осадження, тим вища білкова стійкість пива.

Тема 6. Біотехнологія карбонових та амінокислот.

Лабораторна робота №1.

Тема роботи: «Аналіз лимонної кислоти».

Реактиви: 0,1 М NaOH, 0,1 М HCl, мірні колби на 500 мл, мірні циліндри на 50 мл, фарфорові чашки, лійки, фільтрувальний папір

Обладнання: термостат ТС-80, кондуктометр МІ 170, електронні ваги, дистильована вода.

Методика визначення

Суть методу кондуктометричного титрування полягає у вимірюванні електропровідності розчину електроліту після додання до нього певних незначних порцій титранту. Після чого будують криву титрування в координатах «W-V», де V - об'єм титранту, що пішов на титрування. Точку еквівалентності визначаються за різкою зміною ходу кривої, яка пов'язана з різною рухливістю іонів, які приймають участь у хімічній реакції. Характер кривої титрування залежить від природи електролітів, що взаємодіють та рухливості іонів в розчині, але на ній обов'язково повинна бути точка перегину.

Кондуктометричне визначення точки еквівалентності використовують в:

- комплексонометричному титруванні, де утворення комплексів супроводжується виділенням в розчин вільних протонів;
- осаджувальному титруванні, під час проведення якого застосовують титранти, що утворюють осад з досліджуваними речовинами, тобто де має місце зв'язування більш рухливих іонів і перехід їх в осад;
- методі нейтралізації, що ґрунтується на зв'язуванні гідроксид-іонів та протонів у сполуки, що практично не дисоціюють;
- окисно-відновних реакціях.

Розглянемо, як змінюється електропровідність розчину при титруванні сильної кислоти (HCl) лугом (NaOH). У розчині під час титрування перебігає така хімічна реакція:



Електропровідність вихідного розчину хлоридної кислоти становить великі значення внаслідок наявності в ньому великої кількості рухливих іонів H^+ . При доданні до розчину лугу іони OH^- взаємодіють з іонами H^+ утворюючи молекули води, які не дисоціюють. Замість іонів гідрогену в розчині з'являються менш рухомі катіони натрію. Електропровідність розчину при цьому буде поступово зменшуватися, доки усі іони H^+ , не будуть заміщені на іони натрію. Мінімальне значення електропровідності буде в точці еквівалентності - в момент повної нейтралізації кислоти лугом. Після досягнення точки еквівалентності подальше додання лугу буде призводити до зростання провідності розчину внаслідок появи в ньому рухливих іонів OH^- .

Техніка виконання кондуктометричного титрування.

Перед початком аналізу поверхню електродів необхідно очистити. Кондуктометр включають у мережу і прогрівають протягом 5 хв. Заповнюють бюретку титрантом: в даному випадку розчином лугу. Для титрування застосовують мікробюретки, які дозволяють доливати титрант порціями на 0,1 мл. Далі у комірку піпеткою вносять 10 мл 0,01 М розчину хлоридної кислоти. Якщо розчин не покриває повністю електроди датчика, то в комірку додають дистильовану воду, доки отвори на електроді не будуть повністю покриті рідиною.

Включають магнітну мішалку і через 1-2 хв вимірюють вихідну електропровідність розчину. При безперервному перемішуванні з бюретки доливають певними порціями, наприклад по 0,1 мл, розчин лугу. Після кожної доданої порції лугу очікують 1 - 2 хв, після чого реєструють електропровідність розчину, доки не буде виявлена точка еквівалентності даної реакції, якій відповідає мінімальне значення електропровідності. Після проходження точки перегину електропровідність визначають ще в 4-5 точках. Титрування повторюють до одержання трьох збіжних результатів, які розрізняються не більш, ніж на 0,1 мл. Під час титрування електропровідність розчину змінюється не тільки унаслідок заміни іонів з однією рухливістю іонами з іншою рухливістю, а й в результаті розбавлення розчину. Для запобігання цього концентрація титранту повинна бути на порядок більша за концентрацію розчину, що титрують.

Для знаходження точки еквівалентності користуються графічним методом. Для цього будують графік, на осі абсцис якого відкладають об'єм розчину лугу відомої концентрації (титранту), а на осі ординат - електропровідність досліджуваного розчину. На першій стадії титрування електропровідність лінійно знижується при доданні у розчин титранту, а після проходження точки еквівалентності лінійно зростає. Еквівалентну точку знаходять методом екстраполяції – подовженням прямих до їх перетинання.

Кислотність плодово-ягідної сировини визначається вмістом в ній харчових кислот, а саме винної, лимонної, щавлевої, яблучної. Що стосується цитрусової сировини, то у мандаринах, лимонах та апельсинах основною і практично єдиною харчовою кислотою є лимонна. Сумарний вміст всіх других кислот не перевищує 1% від вмісту в цих плодах лимонної кислоти. Таким чином визначення загальної кислотності цитрусової сировини та відповідних соків на її основі фактично визначає визначення вмісту лимонної кислоти. Методика визначення ґрунтується на екстракції лимонної кислоти плодово-ягідної сировини і наступному кондуктометричному титруванні водного екстракту розчином натрій гідроксидом.

Порядок виконання роботи

1. Визначення вмісту лимонної кислоти у лимоні та лаймі.

У порцеляновій чашці на аналітичних вагах зважують наважку подрібненої і відокремленої від кісточок досліджуваної сировини. Маса наважки має бути в інтервалі 50 - 100 г. Пробу кількісно переносять у мірну колбу об'ємом 500 мл. Залишки соку і мезги у чашці ретельно змивають дистильованою водою в мірну колбу, яку поміщають на 2 години у термостат, нагрітий до температури $80 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Після охолодження до кімнатної температури розчин доводять дистильованою водою до мітки, перемішують і фільтрують. Піпеткою відбирають 50 мл прозорого фільтрату, поміщають його в кондуктометричну комірку і при безперервному перемішуванні титрують 0,1 М розчином натрій гідроксиду. Після додання кожної порції титранту, об'єм якого повинен знаходитися в інтервалі 0,1- 0,5 мл, реєструють покази кондуктометра. Далі будують криву кондуктометричного титрування в координатах «W - VNaOH». За згином на графіку знаходять об'єм NaOH, що

пішов на титрування лимонної кислоти . Вміст лимонної кислоти у досліджуваних зразках рослинної сировини розраховують за формулою:

$$\omega = 0,007 \cdot V1 \cdot V2 \cdot 100 / V3 \cdot m, (1)$$

де ω - вміст лимонної кислоти у досліджуваній сировині, мас. %;

V1 - об'єм мірної колби, мл;

V2 - об'єм розчину NaOH, що пішов на титрування, мл;

V3 - об'єм фільтрату, взятий для титрування, мл;

m - маса наважки сировини, г;

0,007- титр розчину NaOH за лимонною кислотою, г/мл.

Отримані результати заносять до табл. 1.

2. *Визначення вмісту лимонної кислоти у апельсині та грейпфруті.*

У порцеляновій чашці на аналітичних вагах зважують наважку подрібненої і відокремленої від кісточок досліджуваної сировини. Маса наважки має бути в інтервалі 50- 100 г. Пробу кількісно переносять у мірну колбу об'ємом 500 мл. Залишки соку і мезги у чашці ретельно змивають дистильованою водою в мірну колбу, яку поміщають на 2 години у термостат, нагрітий до температури $80 \pm 1^\circ\text{C}$. Після охолодження до кімнатної температури розчин доводять дистильованою водою до мітки, перемішують і фільтрують. Піпеткою відбирають 50 мл прозорого фільтрату, поміщають його в кондуктометричну комірку, додають 5 мл 0,1 М HCl і при безперервному перемішуванні титрують 0,1 М розчином натрій гідроксиду. Після додання кожної порції титранту, об'єм якого повинен знаходитися в інтервалі 0,1-0,5 мл, реєструють покази кондуктометра. Далі будують криву кондуктометричного титрування в координатах «W - VNaOH». За згинами на графіку знаходять об'єми V1 і V2 (NaOH), що потратили на титрування лимонної кислоти.

Вміст лимонної кислоти у досліджуваних зразках рослинної сировини розраховують за формулою:

$$\omega = (0,007 \cdot (V2 - V1) \cdot V3 \cdot 100) / V4 \cdot m, (2)$$

де ω - вміст лимонної кислоти у досліджуваній сировині, мас. %;

V1 - об'єм розчину NaOH, що пішов на титрування, сильних кислот, мл;

V2 - об'єм розчину NaOH, що пішов на титрування, слабких кислот, мл;

V3 - об'єм мірної колби, мл;

V4 - об'єм фільтрату, взятий для титрування, мл;

m - маса наважки сировини, г;

0,007- титр розчину NaOH за лимонною кислотою, г/мл.

Отримані результати заносять до табл. 7.

№ з/п	Досліджуваний продукт	VNaOH	ω , мас. %

Лабораторна робота № 2.

Тема роботи: «Визначення кількості молочної кислоти методом титрування».

Мета роботи: визначити кількість молочної кислоти методом титрування в кисломолочних продуктах.

Теоретичні відомості

Виробництво молочної кислоти на Україні здійснюється вже більше 50 років. Її виготовляють згідно з вимогами ГОСТу 490-79 “Кислота молочна харчова. Технічні умови”. Діючий стандарт поширюється на кислоту, одержану збродженням цукровмісної (цукорсирець, цукор-пісок, патока рафінадна, меляса бурякова) і лактовмісної сировини (сироватка молочна) молочнокислими бактеріями *Lactobacillus delbrukii*, *L. plantarum* та ін. Рис.38. Формула молекули молочної кислоти ($C_3H_6O_3$).

Мікробіологічне виробництво молочної кислоти проводять за наступною схемою:

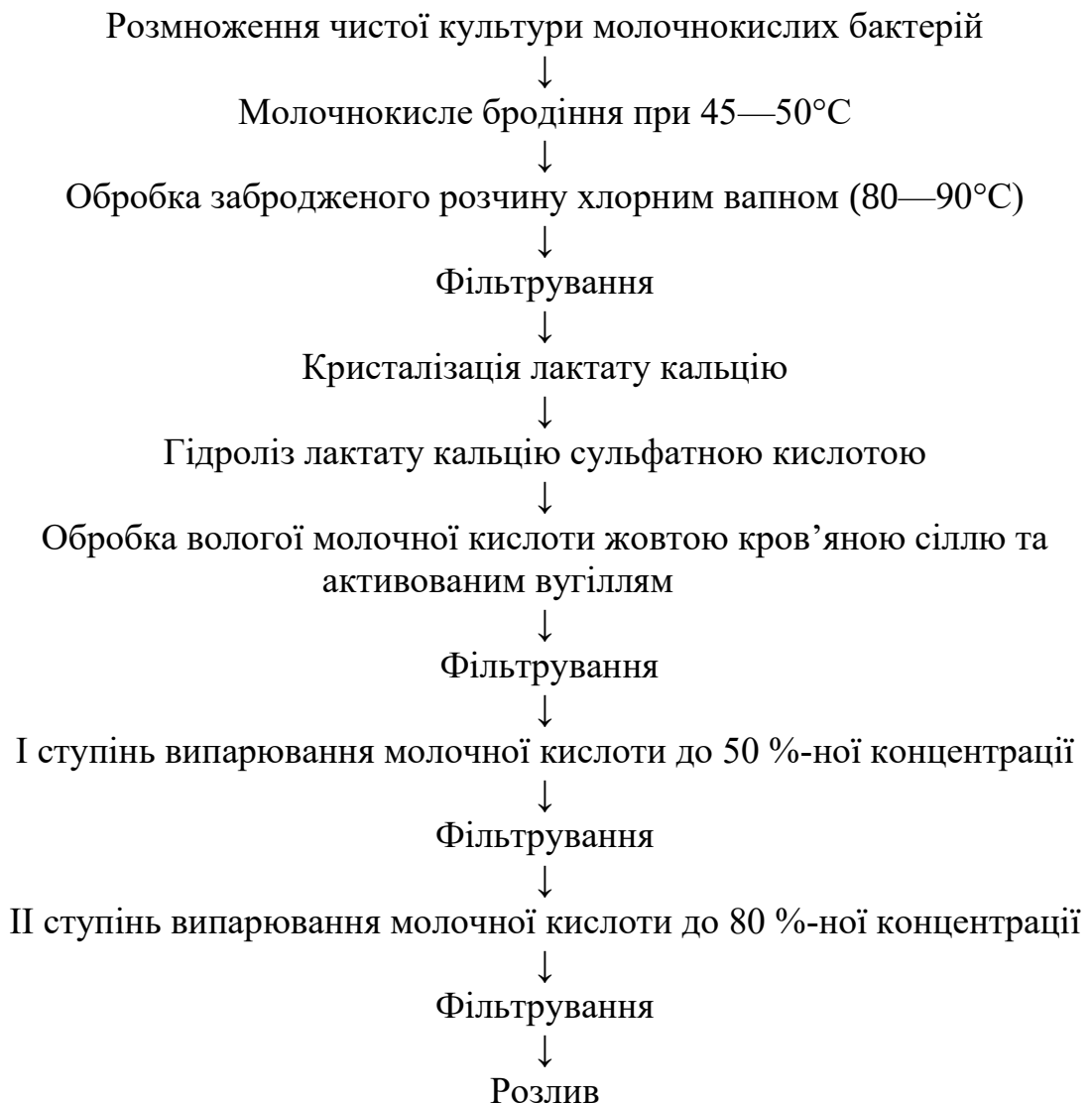


Рис. 3. Схема мікробіологічного виробництва молочної кислоти

Методика визначення

Утворення молочної кислоти є найважливішою ознакою, за якою можна говорити про ефективність молочнокислого бродіння і відповідно про якість одержуваного кисломолочного продукту. Кількість молочної кислоти в досліджуваній пробі визначають методом титрування розчином NaOH. Кислотність молока або кисломолочного продукту виражають у градусах Тернера (°Т) або відсотках молочної кислоти. Так, 1°Т відповідає 1 мл 0,1 н. розчину NaOH, який пішов на титрування 100 мл досліджуваного середовища. Оскільки відомо, що молекулярна маса молочної кислоти становить 90 г/моль, то для приготування 1 л 1 н. розчину потрібно 90 г кислоти, значить, в 1 мл 0,1 н. розчину міститься 0,009 г кислоти, що дорівнює 1°Т. Для кожного з вироблених молочною промисловістю продукту існують норми по кислотності, затверджені Міністерством охорони здоров'я, які свідчать про якість продукту.

Кількість молочної кислоти визначають методом титрування і за різницею між обсягами 0,1н. розчину NaOH, який було використано на титрування середовища культивування до і після росту бактерій.

1. Для титрування беруть 10 мл культуральної рідини розміщують в колбу Ерленмейера, додають 20 мл дистильованої води, 1 - 2 краплі фенолфталеїну і титрують 0,1 н. розчином NaOH при постійному збовтуванні до появи стійкого слаборожевого забарвлення.

2. Кислотність молока або культуральної рідини виражають у градусах Тернера (° Т) або відсотках молочної кислоти. Так, 1°Т відповідає 1 мл 0,1 н. розчину NaOH, який пішов на титрування 100 мл середовища. Загальний вміст молочної кислоти виражається у відсотках. Оскільки відомо, що молекулярна маса молочної кислоти становить 90 г/моль, то для приготування 1 л 1 н. розчину потрібно 90 г кислоти, значить, в 1 мл 0,1 н. розчину міститься 0,009 г кислоти, що відповідає 1°Т.

$$k = x \text{ лугів} \times V \text{ м.к.}$$

де k - кислотність молока, °Т;

x лугів – об'єм гідроксиду натрію (лугів), який пішов на титрування, мл;

V м.к- об'єм дослідженої проби, мл.

3. Досліджуваний зразок (молоко, кефір, сметана, вершки, культура молочнокислих бактерій і т. д.) змішують з дистильованою водою у співвідношенні 1: 3, центрифугують 5 хв. при 12 000 об/хв., супернатант зливають в чисту пробірку.

4. 10 мл досліджуваного супернатанта поміщають в колбу Ерленмейера.

5. До проби додають 1-2 краплі фенолфталеїну і титрують 0,1 н. розчином NaOH при постійному збовтуванні до появи стійкого слаборожевого забарвлення.

6. Визначають обсяг витраченого на титрування 0,1 н. розчину NaOH, визначають кількість молочної кислоти в °Т.

7. На підставі отриманих даних роблять висновок про якість досліджуваного продукту. Допустимі норми кислотності в °Т продуктів молочної промисловості наведено в табл.8.

Таблиця 8.

Допустимі норми кислотності в °Т продуктів молочної промисловості

Продукт	Кислотність (в °Т)
Молоко	16-18
Ацидофілін	75-130
Ряжанка	85-150
Варенець	75-120
Йогурт	85-150
Мацоні	75-120
Кефір	70-120
Творог	240
Сметана	60-100
Вершки	17-18
Кумис	60-120

Тема 7. Біотехнологія амінокислот.

Лабораторна робота № 1.

Тема роботи: Способи отримання L-амінокислот.

Проаналізувати та засвоїти методи хімічного та мікробного синтезу амінокислот, можливості використання білкових гідролізатів та хіміко-мікробіологічного методу на прикладі (синтез метіоніну, лізину, аспарагінової кислоти та ін.).

Дослід 1. Якісні реакції виявлення амінокислот

Проаналізувати приклади виявлення окремих амінокислот, наведених в таблиці, за кольоровими реакціями, що ґрунтуються на хімічній природі радикалів.

Таблиця 9.

Реакції	Реактиви	Амінокислота, що визначається	Забарвлення
Мілона	суміш нітратів та нітритів ртуті (I) і (II), розчинених у концентрованій азотній кислоті	тирозин	червоне
Ксантопротеїнова	концентрована азотна кислота, при нагріванні	тирозин, фенілаланін, триптофан	жовте
Сакагучі	гіпоброміту натрію + α -нафтол	аргінін	червоне
Фоля	розчин ацетату свинцю + гідроксид натрію, при нагріванні	цистеїн, цистин	бурий або чорний осад
Адамкевича	глюксонова кислота в кислому середовищі + концентрована сірчана кислота	триптофан	червоно-фіолетове
Паулі	розчин сульфаноїлової кислоти в соляній кислоті та розчин нітриту натрію + розчин карбонату натрію	гістидин, тирозин	вишнево-червоне

1. Ксантопротейнова реакція.

В ароматичних амінокислотах, які містять бензольні кільця (тирозин, триптофан, фенілаланін) під дією азотної кислоти здійснюється реакція нітрування бензольного кільця з утворенням забарвленої у жовтий колір нітросполуки.

У реакції гідроксиду натрію з хіноїдною формою динітротирозину утворюється натрієва сіль динітротирозину, яка має оранжеве забарвлення.

Реактиви. Водний 0,01%-й розчин тирозину, концентрована азотна кислота, 10%-й розчин гідроксиду натрію.

Обладнання. Скляні палички, пробірки, штатив для градуйованих пробірок, піпетки, пальник.

Методика визначення

У пробірку вносять 3 мл розчину тирозину та 1 мл концентрованої азотної кислоти. Суміш обережно нагрівають до появи жовтого забарвлення. Після охолодження в пробірку додають розчин гідроксиду натрію до появи оранжевого забарвлення.

2. Реакція Фоля на сірковмісні амінокислоти

При тривалому нагріванні рідина, що містить сірковмісні амінокислоти (цистеїн, цистин, метіонін) і білки, в яких присутні ці амінокислоти, набуває бурого кольору, і випадає чорний осад сірчистого свинцю. Реакція проходить у дві стадії: перша стадія – перехід сірки із органічної сполуки в неорганічну; друга стадія – якісне виявлення сірки в розчині. Під час кип'ятіння цистеїну та цистину в лужному середовищі від них легко відщеплюється сірка у вигляді сірководню, який в лужному середовищі утворює сульфід натрію.

Сульфід натрію можна виявити за допомогою важких металів, наприклад, іонів свинцю, які утворюють з іонами сірки нерозчинний сульфід свинцю чорного кольору. Для цього можна використати ацетат свинцю.

Реактиви. Водний 0,01%-й розчин цистеїну, реактив Фоля (до 10%-го розчину ацетату свинцю додають 10%-й розчин гідроксиду натрію до розчинення осаду, що утворився), концентрований розчин гідроксиду натрію.

Обладнання. Скляні палички, штатив із пробірками градуйованими, піпетки, водяна баня, годинник.

Методика визначення

У пробірку вносять 1 мл розчину цистеїну, 2 мл конц. розчину гідроксиду натрію та 1 мл реактиву Фоля. Суміш перемішують і кип'ятять на водяній бані 2 хв. Через 3—5 хв випадає бурий чи чорний осад сульфиду свинцю.

3. Реакція з азотистою кислотою

Продуктом взаємодії α -амінокислоти з азотистою кислотою, яка утворюється в реакції нітриту натрію з оцтовою кислотою, є газоподібний азот.

Реактиви. Водний 1%-й розчин гліцину, 5%-й розчин нітриту натрію, концентрована оцтова кислота.

Обладнання. Пробірки, крапельниці, штатив для пробірок.

Методика визначення

У пробірку вносять п'ять крапель розчину гліцину, п'ять крапель нітриту натрію, дві краплі концентрованої оцтової кислоти й обережно збовтують. Спостерігають виділення газу.

4. Утворення комплексної солі міді

Під час нагрівання амінокислоти з карбонатом міді (II) утворюється комплексна сполука міді, яка має синє забарвлення.

Реактиви. Водний 1%-й розчин гліцину, сухий карбонат міді.

Обладнання. Пробірки, штатив для пробірок, тримач пробірок, пальник.

Методика визначення

У пробірку вносять 1 мл розчину гліцину, а на кінчику лопатки – сухий карбонат міді (II). Суміш нагрівають у полум'ї пальника до кипіння. Розчин забарвлюється в синій колір.

5. Реакція Адамкевича на триптофан

Триптофан у кислому середовищі вступає в реакцію з гліоксиловою кислотою (альдегідами), утворюючи забарвлені в червоно-фіолетовий колір продукти конденсації.

Реактиви. Водний 0,01%-й розчин триптофану, льодяна оцтова кислота, концентрована сірчана кислота.

Обладнання. Пробірки градуйовані, піпетки, штатив для пробірок, водяна баня, годинник.

Методика визначення

До 0,5 мл розчину триптофану додають 0,5 мл льодяної оцтової кислоти, яка завжди містить невелику кількість гліоксилової кислоти. Отриману суміш спочатку нагрівають, а потім охолоджують і по стінці пробірки обережно, по краплинам, щоб рідини не змішувалися, додають 1 мл концентрованої сірчаної кислоти. Через 10 хв на межі розподілу двох шарів утворюється червоно-фіолетове кільце. Реакцію можна прискорити, якщо поставити пробірку з реагуючою сумішшю в киплячу водяну баню.

6. Реакція Вуазене на триптофан

Триптофан, конденсуючись із формальдегідом, утворює забарвлений продукт конденсації біс-2-триптофанілметан, який окиснюється до біс-2-триптофанілкарбіноду. За наявності мінеральних кислот біс-2-триптофанілкарбінол утворює солі, забарвлені у синьо-фіолетовий колір.

Реактиви. Водний 0,01%-й розчин триптофану, водний 2,5%-й розчин формальдегіду, концентрована сірчана кислота, 0,5%-й розчин нітрату натрію.

Обладнання. Скляні палички, пробірки градуйовані, піпетки, крапельниці, штатив для пробірок, годинник, ванночка з льодом.

Методика визначення

До 2 мл розчину триптофану додають одну краплю розчину формальдегіду, суміш перемішують і вливають порціями по декілька крапель 6 мл концентрованої сірчаної кислоти, охолоджуючи пробірку у ванночці з льодом. Суміш знову перемішують і дають відстоятися 10 хв. Потім, перемішуючи суміш, у пробірку вносять десять крапель розчину нітрату натрію; з'являється інтенсивне синьо-фіолетове забарвлення.

Лабораторна робота № 2.

Тема роботи: Розділення амінокислот за допомогою розподільної хроматографії на папері

Реактиви: набір амінокислот, суміш амінокислот, суміші розчинників:
а) н-бутанол-оцтова кислота-вода (4:1:5); б) ацетон-вода (3:2); в) н-бутанол-бензиловий спирт (1:1), розчин нінгідрину в ацетоні.

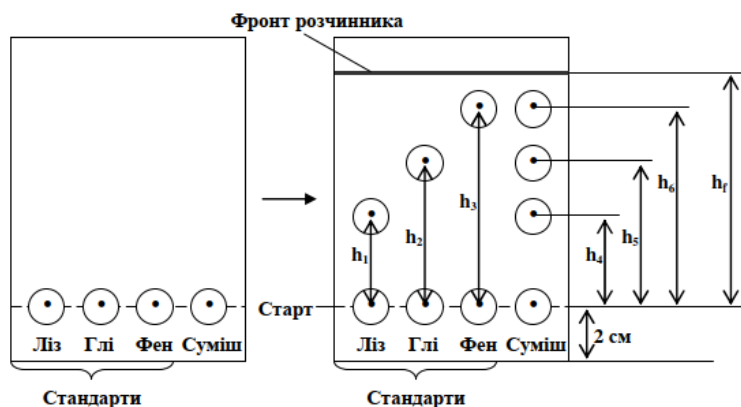
Обладнання: прилад для виконання висхідних хроматограм, олівець, лінійка, скляні капіляри, хроматографічний папір.

Методика визначення

1. Одержати контрольну задачу – розчин суміші невідомих амінокислот та аркуш хроматографічного паперу, відрізати за розміром циліндра і розкреслити, як вказано на рис. 1.

2. За допомогою лінійки провести на відстані 2 см від нижнього краю горизонтальну лінію старту. Намалювати кільця діаметром 3 мм на відстані 2 см одне від одного та проставити над ними порядкові номери. Від лінії старту на відстані 10 см провести лінію фінішу.

3. Нанести розчини амінокислот на папір. Папір покласти на попередньо ретельно вимите скло, щоб частина де намальовані кільця, знаходилася в повітрі. Капілярами, для кожного розчину, на папір в кільця послідовно нанести краплі розчинів сумішей, що досліджуються, та “свідків”. Розчин на кожне кільце нанести 5-6 разів після висихання попередньої краплі.



4. Після висихання нанесених крапель ретельно вимити руки з милом, згорнути папір у циліндр та зшити аркуш через край так, щоб одержати більш чи менш правильний циліндр. На дно скляного циліндра налити суміш н-бутанолу, оцтової кислоти, води (4:1:5). Висота шару розчинника не повинна бути вища, ніж 1 см від дна циліндра.

5. Паперовий циліндр обережно вставити вертикально в скляний циліндр так, щоб він не торкався стінок і щоб нанесені краплі знаходились на нижньому кінці паперового циліндра.

6. Скляний циліндр щільно закрити кришкою з гумовою прокладкою і залишити стояти до тих пір, доки розчинник підніметься до лінії фінішу. Після цього вийняти паперовий циліндр, розрізати шов, розправити папір та висушити його під тягою чи в сушильній шафі (70-80°C).

7. Проявити хроматограму: проявник для α -амінокислот використовувати розчин нінгідрину ($\omega(\text{нінгідрину})=0,5\%$) в ацетоні. Цим розчином обприснути хроматограму декілька разів з пульверизатора так, щоб папір став тільки слабо вологим та на ньому не утворювались би розмиті струмені розчину. Потім висушити папір на повітрі та прогріти в сушильній шафі при 110°C до появи лілових плям. Значно краще висушити хроматограму поступово в темряві. Плями, що проявилися, легко обвести олівцем та при бажанні закріпити розчином нікелю сульфату, після чого ще раз просушити хроматограму на повітрі.

8. Якісний склад контрольної суміші амінокислот визначити за значенням R_f кожної плями, порівнюючи з R_f , що обчислені за хроматограмою для “свідків”. Значення R_f амінокислот цієї системи: гліцин 0,13; аланін 0,18; валін 0,36; фенілаланін 0,46.
Оформити висновок.

Лабораторна робота № 3.

Тема роботи: Промислове виробництво амінокислот

З усіх можливих способів отримання амінокислот (хімічним шляхом, мікробіологічним тощо) перевага віддається мікробіологічному: хоча організацію мікробного виробництва не можна назвати простою, її перевага полягає в синтезі оптично чистих (L- амінокислот), тоді як при хімічному синтезі виходить рацемічна суміш L- і D-амінокислот, яку важко розділити.

Мікробний синтез амінокислот заснований на культивуванні конкретного продуцента цільової кислоти в середовищі заданого складу при суворо визначених параметрах ферментації. Продуцентами є штами бактерій, отримані мутантною селекцією або за допомогою методів генної інженерії. Бактерії-мутанти, з одного боку, втратили здатність самостійно синтезувати деякі речовини, а з іншого боку, придбали здатність до зверхсинтезу цільової амінокислоти.

Вже до 70-х років минулого століття були отримані мікроби-суперпродуценти родів *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, за допомогою яких можливо синтезувати всі відомі амінокислоти. В даний час є суперпродуценти, у яких кількість синтезованого специфічного білку досягає 10-50% (тут найважливішу роль відіграють плазміди, що несуть вбудовані гени). Технологія отримання амінокислот базується на принципах ферментації продуцентів і виділення первинних метаболітів, тобто розмножують маткову культуру спочатку на агаризованому середовищі в пробірках, потім - на рідкому середовищі в колбах, інокуляторах і посівних апаратах, а потім - в основних ферментаторах. Якщо амінокислота передбачена в якості добавки до кормів, то біотехнологічний процес кормового продукту включає наступні стадії: ферментацію, стабілізацію амінокислоти в культуральній рідині перед випарюванням, вакуум-упарення, стандартизацію упареного розчину при додаванні наповнювача, висушування і упаковку готового продукту, в якому повинно міститися не більше 10% основної речовини. Якщо ж амінокислота

використовується в якості лікарського препарату, в цьому випадку отримують ізольовані чисті кристали, які висушують під вакуумом і упаковують.

Відомо два способи отримання амінокислот: одноступінчатий і двоступінчатий. Відповідно до першого способу, наприклад, мутантний штам - продуцент амінокислоти - культивують на оптимальному для біосинтезу середовищі. Цільовий продукт накопичується в культуральній рідині, з якої його виділяють згідно зі схемою на рис. 3.

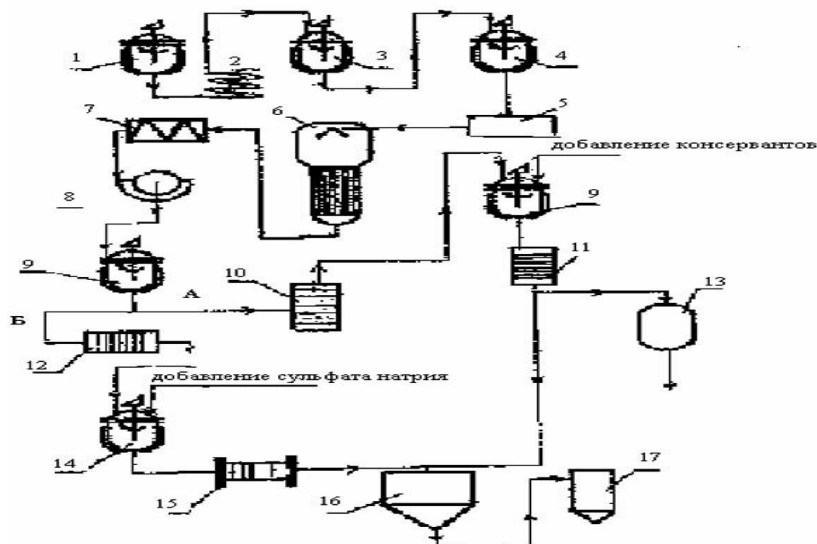


Рис. 4. Орієнтовна технологічна схема отримання амінокислоти:

1 – ферментатор; 2 – охолоджувач; 3, 9 – рефрижератори; 4 – ємність для попередньої обробки; 5 – центрифуга; 6 – вакуум-упаровувач; 7 – апарат прямої обробки амінокислоти; 8 – барабанний фільтр; А, Б – шляхи (при необхідності змикаються); 10 – апарат для ультрафільтрації; 11 – ємність для консервації розчину амінокислоти; 12 – мембранний фільтр; 13 – накопичувач рідкого концентрату; 14 – ємність для осадження амінокислоти; 15 – фільтр-прес; 16 – розпилювальна сушарка; 17 – накопичувач сухого концентрату

Якщо ферменти біосинтезу амінокислоти накопичуються внутрішньоклітинно, то після 1-го ступеня клітини сепарують, дезінтегрується і застосовують клітинний сік. В інших випадках для цілей біосинтезу цільових продуктів застосовують безпосередньо клітини.

У двоступеневому способі мікроб-продуцент культивують в середовищі, де він отримує і синтезує всі необхідні інгредієнти для подальшого синтезу цільового продукту.

Тема 8. Біотехнологія отримання вітамінів.

Лабораторна робота №1

Тема роботи: «Якісне та кількісне визначення вітаміну В1». Якісні реакції.

Дослід 1. Реакція з діазореактивом на тіамін (вітамін В1).

В основі методу лежить здатність тіаміну в лужному середовищі з діазореактивом утворювати сполуки оранжевого або червоного кольору.

Реактиви: розчин сульфанілової кислоти (1%- й), 5%-й розчин нітрату натрію, 10%-й розчин бікарбонату натрію, тіамін (5%-й розчин).

Обладнання: штатив із пробірками, піпетки, шпатель.

Методика визначення

В пробірку наливають 1 мл 1%-го розчину сульфанілової кислоти і 1 мл 5%-го розчину нітрату натрію (утворюється діазореактив). Потім вносять 0,5 мл 5%-го розчину тіаміну і обережно по стінці пробірки додають 1 мл 10%-го 347 розчину бікарбонату натрію. На межі двох рідин утворюється кільце оранжевого або червоного кольору. Спостереження записують у зошит, роблять висновок.

Дослід 2. Реакція окиснення тіаміну в тіохром.

Тіамін у лужному середовищі під впливом $K_3Fe(CN)_6$ окиснюється у тіохром, який в ізобутиловому спирті дає інтенсивну синю флуоресценцію.

Реактиви: розчин тіаміну (5 мкг у 1 мл), 1%-й розчин $K_3Fe(CN)_6$, 30%-й розчин NaOH, ізобутиловий спирт.

Обладнання: джерело ультрафіолетового випромінювання (флуороскоп), штатив із пробірками, піпетки.

Методика визначення

До 1 мл розчину тіаміну (5 мкг у 1 мл) додають 2 мл суміші (1 мл 1%-го розчину $K_3Fe(CN)_6$ і 1 мл 30%-го розчину NaOH), інтенсивно перемішують і залишають на 3 хв. Потім додають 5 мл ізобутилового спирту і струшують протягом 2 хв. Ізобутиловий екстракт тіохрому в ультрафіолетовому промінні має інтенсивну синю флуоресценцію. Спостереження записують у зошит, роблять висновок.

Кількісні реакції.

Дослід . Визначення вмісту вітаміну B1 (тіаміну) в тканинах.

Принцип методу полягає у вивільненні зв'язаних форм тіаміну шляхом кислотного та ферментативного гідролізу, кількісному перетворенні тіаміну в тіохром та вимірюванні інтенсивності флуоресценції тіохрому за допомогою флуориметра, що забезпечує збудження при довжині хвилі 360– 390 нм, флуоресценції – 400–450 нм.

Реактиви: тканина печінки або мозку (1 г), 0,25 н. HCl (охолоджена), насичений водний розчин ацетату натрію, амілорізін (1 мг/мл), окиснювальна суміш (до 2 мл 1%- го розчину червоної кров'яної солі (гексаціанофериту) додають 10 мл 30%-го розчину гідроксиду натрію і ретельно перемішують), 30%-й розчин гідроксиду натрію, ізобутиловий спирт, основний стандартний розчин тіаміну (його готують з наважки 0,1 г, яку вміщують у мірну колбу на 1 л, доводять до мітки дистильованою водою, ретельно перемішують, після чого переносять у склянку з темного скла з притертим корком, додають 0,5 мл толуолу і зберігають не більше одного місяця), робочий розчин тіаміну (який готують розведенням основного стандартного розчину тіаміну безпосередньо перед роботою таким чином, щоб його концентрація складала 0,2 мкг/мл), толуол.

Обладнання: фарфорова ступка із кварцевим склом, товкачик, льодяна баня, колби, піпетки, кипляча водяна баня, годинник, термостат, фільтрувальний папір, лійки для фільтрування, мірний циліндр, флуориметр,

що забезпечує збудження при довжині хвилі 360–390 нм, а флуоресценції – 400–450 нм, кювети для вимірювання інтенсивності флуоресценції.

Методика визначення

1) Гідроліз. Наважку продукту або тканини визначають таким чином, щоб концентрація тіаміну в гідролізаті складала 0,1–0,4 мкг/мл. 1 г тканини (печінка, мозок) швидко розтирають із кварцевим склом на холоді у фарфоровій ступці. Додають 10 мл 0,25 н. HCl (охолодженої), ретельно перемішують і швидко переносять у колбу. Гідроліз проводять на киплячій водяній бані протягом 40 хв, періодично помішуючи. Колбу охолоджують до кімнатної температури і доводять рН до 4,5 насиченим водним розчином ацетату натрію. В гідролізат вносять 2 мл (1 мг в мл) амілоризину і вміщують у термостат на 14–16 годин при 37°C. Гідролізат охолоджують і фільтрують. Вимірюють об'єм. Якщо необхідно перервати аналіз на 1–2 дні, гідролізат кип'ятять 5 хв та зберігають у холодильнику в щільно закритій колбі.

2) Окиснення тіаміну до тіохрому. Окиснювальну суміш готують безпосередньо перед роботою. До 2 мл 1%-го розчину червоної кров'яної солі (гексаціанофериту) додають 10 мл 30%-го розчину гідроксиду натрію і ретельно перемішують. У дві конічні колби з притертим корком відміряють по 5 мл гідролізату. В одну додають 1,2 мл окиснювальної суміші, а в другу – 1,2 мл 30%-го розчину гідроксиду натрію (контроль). Колби енергійно струшують, додають по 10 мл ізобутилового спирту і знову струшують протягом 1 хв для видалення 352 тіохрому. Водний та спиртовий шари розділяють відстоюванням у темному місці або центрифугують. Спиртовий шар (верхній) зливають у кювети для вимірювання інтенсивності флуоресценції. Паралельно проводять окиснення робочого стандартного розчину тіаміну. Основний стандартний розчин тіаміну готують з наважки 0,1 г, яку вміщують у мірну колбу на 1 л, доводять до мітки дистильованою водою, ретельно перемішують. Переносять у склянку з темного скла з притертим корком, додають 0,5 мл толуолу і зберігають не більше одного місяця. Робочий розчин тіаміну готують розведенням основного безпосередньо перед роботою таким чином, щоб концентрація складала 0,2 мкг/мл. Вміст тіаміну X (мг на 100 г продукту) підраховують за формулою:

$$X = \frac{(A_d - A_k) * M * V}{(V_{ст} - V_k) * M_1 * V_1 * 10}, \text{ де}$$

A_d і A_k – показання флуориметра для дослідної проби та контролю до проби;

M – кількість тіаміну в стандартному розчині, взятому для окиснення, мкг;

V – загальний об'єм гідролізату, мл;

$V_{ст}$ і V_k – показання флуориметра для стандартного розчину тіаміну та контролю до стандартного розчину тіаміну;

M_1 – кількість продукту, що взяли для аналізу, г;

V_1 – об'єм зразка, щовзяли для окиснення до тіохрому;

10 – перерахунок з мкг/г в мг/100 г продукту.

Розрахунки вмісту тіаміну в пробі й отриманий результат записують у зошит.

Лабораторна робота №2.

Тема роботи: «Якісне та кількісне визначення вітаміну В2»

Якісні реакції.

Дослід. Реакція відновлення рибофлавіну (вітаміну В2).

Відновлення рибофлавіну призводить до зміни жовтого забарвлення на рожево-червоне, а потім до знебарвлення.

Реактиви: концентрована соляна кислота, металічний цинк, 0,025%-й розчин вітаміну В2 (суспензія рибофлавіну у воді). Обладнання. Штатив із пробірками, піпетка.

Методика визначення

В пробірку наливають 1 мл 0,025%-го розчину рибофлавіну, 0,5 мл концентрованої соляної кислоти і додають металічний цинк. Водень, що виділяється при взаємодії цинку з кислотою, реагує з рибофлавіном, відновлюючи його до лейкофлавіну. Спостереження записують у зошит, роблять висновок.

Кількісні реакції.

Дослід 1. Кількісне визначення рибофлавіну в біохімічних зразках за допомогою рибофлавінзв'язувального білка.

Вміст вітаміну В2, який міститься в крові, тканинах людини, тварин, у харчових продуктах у вигляді вільного рибофлавіну, ФАД і ФМН оцінюють, кількісно визначаючи суму вільного рибофлавіну та рибофлавіну, що утворився в ході кислотного 354 або ферментативного гідролізу. В основі фізикохімічних методів його визначення лежить здатність рибофлавіну до флюоресценції.

Реактиви: наважка тканини (5 – 150 г), 0,1 н. HCl, насичений розчин оцтовокислого натрію, амilorизин ПХ100, конц. HCl, 4 М KН₂РO₄, стандартний розчин рибофлавіну (1 мкг/мл), розчин РБЗБ.

Обладнання: кипляча водяна баня, годинник, термостат, мірний циліндр, мірна колба, фільтрувальний папір, лійки для фільтрування, 30%-вий NaOH, центрифужні пробірки, центрифуга, флуориметр для вимірювань при довжині хвилі збуджуючого світла 465 нм, а світла, що випромінюється – 525 нм, кювети для вимірювання інтенсивності флуоресценції.

Методика визначення

Кислотний та ферментативний гідроліз проводять на киплячій водяній бані протягом 40 хв, додаючи до наважки (5–150 г) 150 мл 0,1 н. HCl. Проби охолоджують до кімнатної температури, доводять значення рН до 4,5 насиченим розчином оцтовокислого натрію. Потім додають 0,1 г амilorизину ПХ-100 на пробу та залишають у термостаті при 37оС на 16–18 год. Гідролізат охолоджують до кімнатної температури, доводять об'єм до 250 мл та фільтрують. Кислотний гідроліз молочних продуктів проводять за спрощеною схемою, додаючи до наважки продуктів концентровану HCl до рН 7,0 та витримуючи на киплячій водяній бані 40 хв. Після охолодження до кімнатної температури осаджують білки, додаючи по краплях 30%-вий NaOH до рН 6,5,

а потім концентровану HCl до рН 4,5. Вимірюють об'єм та центрифугують. Гідролізати використовують для визначення рибофлавіну. До 0,25–1,0 мл кислотного або кисло-ферментативного гідролізату додають рівний об'єм 4 М KH_2PO_4 та дистильовану воду до 3 мл. Вимірюють флуоресценцію (А) при довжині хвилі збуджуючого світла 465 нм, а світла, що випромінюється – 525 нм, додають 100 мл стандартного розчину рибофлавіну з концентрацією 1 мкг/мл, вимірюють флуоресценцію (С), потім додають по 30 мкл розчину РБЗБ, перемішуючи та вимірюючи флуоресценцію після кожного додавання білка, доки вона не перестане знижуватися після двох добавок (В). Розрахунок концентрації рибофлавіну (мл на 100 г продукту) проводять:

$$X = \frac{(A-B') \cdot 0,1 \cdot V}{(C'-A) \cdot V_1 \cdot a \cdot 10}, \text{ де}$$

C' і B' розраховують з урахуванням розведення при додаванні стандартного розчину рибофлавіну, множать C' і B' на відповідні розведення; 0,1 – кількість рибофлавіну, що внесена в кювету;

V – вихідний об'єм гідролізату, мл;

V_1 – об'єм гідролізату, внесений у кювету, мл;

A – наважка продукту, г;

10 – коефіцієнт перерахунку в мг/100 г продукту.

Розрахунки вмісту рибофлавіну в пробі й отриманий результат записують у зошит.

Дослід 2. Визначення рибофлавіну в сечі та сироватці крові.

Реактиви: сеча, сироватка крові, 50 мМ трисHCl-буфер із рН 7,5, стандартний розчин рибофлавіну (2 мкг/мл), розчин РБЗБ, 10% ТХО, центрифужні пробірки, центрифуга (3000 g), 4 М KH_2PO_4 , стандартний розчин рибофлавіну (0,5 мкг/мл).

Обладнання: штатив із пробірками, піпетки, центрифужні пробірки, центрифуга (3000 g), флуориметр для вимірювань при довжині хвилі збуджуючого світла 465 нм, а світла, що випромінюється – 525 нм, кювети для вимірювання інтенсивності флуоресценції.

Методика визначення

Для титрування рибофлавіну у сечі за допомогою РБЗБ до 0,1 мл сечі додають 3 мл 50 мМ трис-HClбуферу, рН 7,5, вимірюють флуоресценцію (А), додають 30 мкл стандартного розчину рибофлавіну з концентрацією 2 мкг/мл, вимірюють флуоресценцію (С). Потім додають по 30 мкл розчину РБЗБ, перемішують та вимірюють флуоресценцію після кожного додавання білка. Додавання білка продовжують до тих пір, поки флуоресценція перестає зменшуватися (В). Оскільки при додаванні стандарту рибофлавіну та РБЗБ об'єм у кюветі збільшується незначно, розведенням нехтують. Розрахунок концентрації рибофлавіну у сечі проводять за формулою:

$$X = \frac{(A-B) \cdot 0,02 \cdot 31}{(C-A)} \text{ (мкг/мл), де}$$

31 – розведення сечі.

Розрахунки вмісту рибофлавіну в сечі й отриманий результат записують у зошит.

Для визначення концентрації рибофлавіну в сироватці крові до 1 мл сироватки додають 100 мкл 10% ТХО та центрифугують при 3000 g. До 0,6 мл центрифугата додають 0,2 мл 4 М KH_2PO_4 та 2 мл дистильованої води, вимірюють флуоресценцію (А), додають 30 мкл стандартного розчину рибофлавіну (0,5 мкг/мл), вимірюють флуоресценцію (С) і титрують РБЗБ як і у випадку з сечею. Результат і розрахунки записують у зошит.

Лабораторна робота №3.

Тема роботи: «Якісне та кількісне визначення вітаміну С».

Якісні реакції.

Дослід 1. Відновлення метиленового синього та 2,6- дихлорфеноліндофенолу аскорбіновою кислотою.

Аскорбінова кислота (вітамін С) може легко вступати в окисно-відновні реакції і відновлювати метиленовий синій та 2,6-дихлорфеноліндофенол, перетворюючи їх на безбарвні сполуки.

Реактиви: розчин 2,6-діхлорфеноліндофенолу (0,1%-й), 10%-й розчин соляної кислоти, 0,1%-й розчин аскорбінової кислоти (або 1%-ва витяжка шипшини), 0,01%-й розчин метиленового синього, 10%-й розчин Na_2CO_3 .

Обладнання: штатив із пробірками, крапельниця, піпетки, термостат.

Методика визначення

У першу пробірку наливають по одній краплині 0,01%-го розчину метиленового синього і 10%-го розчину Na_2CO_3 та додають 5 крапель 1%-вої витяжки шипшини або 5 крапель 0,1%-го розчину аскорбінової кислоти. Залишають на деякий час у термостаті при 37–40 °С. У другу пробірку вносять 0,5 мл 0,1%-го розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу (синього кольору), 1–2 краплі 10%-го розчину HCl і по краплях розчин аскорбінової кислоти. Рідина в обох пробірках знебарвлюється.

Спостереження записують у зошит, роблять висновок.

Дослід 2. Відновлення $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ аскорбіновою кислотою.

Аскорбінова кислота відновлює $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ до $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, який, реагуючи з FeCl_3 , утворює сполуку синього кольору.

Реактиви: 0,1%-й розчин аскорбінової кислоти (або 1%-ва витяжка шипшини), 1%-й розчин $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 1%-й розчин FeCl_3 .

Обладнання: штатив із пробірками, крапельниця, піпетки, термостат.

Методика визначення

У дві пробірки вносять по 1—2 краплини 1%-го розчину $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ і 1%-го розчину FeCl_3 . В одну з пробірок додають 5–10 крапель витяжки з шипшини або 0,1%-го розчину аскорбінової кислоти, а в другу – 5–10 крапель

дистильованої води. Рідина в першій пробірці забарвлюється в синьо-зелений колір і випадає синій осад. У другій пробірці зелено-бура рідина не змінюється. Спостереження записують у зошит, роблять висновок.

Кількісні реакції.

Дослід 1. Кількісне визначення вітаміну С у продуктах.

Метод ґрунтується на здатності аскорбінової кислоти окиснюватися до дегідроаскорбінової при взаємодії з 2,6-дихлорфеноліндофенолом, який у кислому середовищі набуває рожево-червоного забарвлення.

Реактиви: соляна кислота (2%-й розчин), натрієва сіль 2,6-дихлорфеноліндофенолу (0,0005 н. розчин, молекулярна маса – 290, грам-еквівалент – 145), харчові продукти (капуста, шипшина, картопля, хвоя).

Обладнання: фарфорова ступка з пестиком, колби, мікробюретка, склянка для титрування, піпетки, лійка, ваги, кварцевий пісок.

Методика визначення

У фарфоровій ступці 1 г харчового продукту ретельно розтирають із кварцевим піском, додають 9 мл 2%-го розчину соляної кислоти, залишають на 10 хв і фільтрують. Для визначення відбирають у колбу 3 мл фільтрату і титрують 0,0005 н. розчином 2,6-дихлорфеноліндофенолу до появи рожевого забарвлення, яке зберігається протягом 30 секунд. Масову концентрацію аскорбінової кислоти розраховують за формулою:

$$C = \frac{0,088 \cdot A \cdot V}{V_1 \cdot a}, \text{ де}$$

0,088 – коефіцієнт для переведення у масові одиниці (1 мл 0,0005 н. розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу відповідає 0,0088 мг аскорбінової кислоти);

A – кількість 2,6-дихлорфеноліндофенолу, витрачена на титрування, мл; V – загальна кількість екстракту, мл;

V₁ – об'єм екстракту, що було взято для титрування, мл;

a – кількість продукту.

Розрахунки вмісту аскорбінової кислоти у досліджувальній пробі й отриманий результат записують у зошит.

Дослід 2. Визначення вітаміну С у сечі.

Реактиви: профільтрована сеча, 0,0005 н. розчин 2,6-дихлорфеноліндофенолу, 5%-й розчин оцтової кислоти.

Обладнання: штатив із пробірками, піпетки, бюретка для титрування.

Методика визначення

2 мл профільтрованої сечі титрують 0,0005 н. розчином 2,6-дихлорфеноліндофенолу до стійкого рожевого забарвлення. Якщо забарвлення самої сечі заважає титруванню, сечу розводять у 2–5 разів 5%-вим розчином оцтової кислоти. Для контролю титрують такий же об'єм 5%-го розчину оцтової кислоти. Вміст аскорбінової кислоти (мг), виділеної з сечею за добу, розраховують за формулою:

$$C = \frac{0,088 * (A-B) * T * V}{V_1}, \text{ де}$$

(A – B) – різниця між кількістю 2,6- дихлорфеноліндофенолу, витраченої на титрування дослідної та контрольної проб, мл;

V – загальний об'єм сечі, зібраної за добу, мл;

V₁ — кількість сечі, взятої для титрування, мл;

T — поправка на титр розчину індикатора.

Розрахунки вмісту вітаміну С у сечі й отриманий результат записують у зошит.

Лабораторна робота №4. Виділення каротиноїдів із зелених частин рослин

Каротиноїди виявляють в зелених частинах рослин шляхом відділення їх від хлорофілу, який маскує оранжеве забарвлення провітаміну А. з цією метою використовують метод паперової хроматографії. **Хід досліду.** Готують наважку (3-5г) зеленої цибулі або іншого джерела каротиноїдів, яку поміщають у фарфорову ступку. Реально розтирають з 2г натрій сульфату, який зневоднює суміш. Додають 5мл етанолу, перемішують та фільтрують. У фільтрат занурюють низ хроматографічного паперу і залишають на деякий час. Після того як фронт розчинника підніметься на 10 - 12см, смужку паперу просушують на повітрі. Фіксують забарвлення окремих ділянок паперу.

Лабораторна робота №5. Якісне визначення вітамінів D та E. Дослід 1. Якісна реакція на вітаміні D.

Вітамін D при взаємодії з аніліновим реактивом при нагріванні забарвлюється в червоний колір.

Реактиви: хлороформ, анілін, хлоридна кислота концентрована, розчин бром у хлороформі.

Методика визначення

а) реакція з хлоридною кислотою. В суху пробірку вносять 3-5 крапель риб'ячого жиру і 5 крапель хлороформу (або розчин вітаміну в олії), перемішують і додають 1мл суміші аніліну та концентрованої соляної кислоти (15:1). При нагріванні жовта емульсія набуває червоного забарвлення. Через 1-2 хв. Емульсія розділяється на два шари, нижній із яких забарвлений в інтенсивний червоний колір.

б) реакція з бромом. В суху пробірку вносять 5 крапель риб'ячого жиру або розчину вітаміну D в олії, додають 5 крапель розчину бром у хлороформі і перемішують. Суміш в пробірці поступово забарвлюється в зелено – голубий колір.

Дослід №2. Якісна реакція на вітамін Е

Спиртовий розчин α – токоферолу окиснюється хлоридом феруму (III) у токоферилхінон і розчин забарвлюється у червоний колір.

Реактиви: 0,1% спиртовий розчин токоферолу, 1% -ий р-н FeCl_3 , нітратна кислота концентрована, сахароза.

Методика визначення

а) В суху пробірку вносять 4-5 крапель 0,1% спиртового розчину токоферолу, потім додають 0,5мл 1% розчину хлориду феруму (III).

Отриманий розчин ретельно перемішують. Вміст пробірки набуває червоного кольору.

б) До розчину вітаміну Е додають декілька крупинок сахарози і 10 крапель концентрованої нітратної кислоти. При перемішуванні спостерігається червоне забарвлення.

Тема 9. Біотехнологія ферментів.

Лабораторна робота №1.

Тема роботи: «Аналіз ферментних препаратів: уреази»

Уреаза - фермент, який продукується рядом бактерій *Bacillus pasteurii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*. Уреаза викликає гідролітичне дезамінування сечовини і використовується для визначення сечовини для промислових та медичних цілей (в результаті гідролітичного дезамінування утворюється аміак і вуглекислий газ).

Дослід №1. Уреазний метод визначення сечовини.

Реактиви: уреаза, 0,1н розчин соляної кислоти, індикатор метиловий червоний, 0,1н розчин їдкого натрію.

Методика визначення

Наважку сечовини (карбаміду) $0,5000 \pm 0,0002$ г розчиняють в воді в мірній колбі на 250 мл. 25 мл одержаного розчину нейтралізують 0,1н розчином соляної кислоти або їдкого натрію по метиловому червоному, додають до розчину 0,1г уреази, закривають колбу корком, перемішують та витримують 1 год при кімнатній температурі. Відтак, обережно відкривши корок, додають 25 мл 0,1н розчину соляної кислоти, збовтують розчин для поглинання залишків аміаку, що може знаходитися в паровій фазі, відкривають колбу і 10 хв барботують через розчин повітря, попередньо продуте через розчин кислоти та лугу. Одержаний розчин титрують 0,1н розчином їдкого натрію в присутності метиленового червоного. аналогічно проводять контрольний дослід.

Примітка:

Метод ґрунтується на гідролізі карбаміду уреазою з виділенням аміаку та визначенні кількості останнього.

Вміст сечовини (карбаміду) X знаходять за формулою:

$$X = (v_k - v_d) K V_o 3,003 / m V_1, \text{ де}$$

v_k, v_d - об'єми 0,1н розчину NaOH , що пішли на титрування контрольної та дослідної проби, мл;

3,003 - маса карбаміду, що відповідає 1мл точно 0,1н гідроксиду натрію;
K - поправочний коефіцієнт для приведення концентрації розчину гідроксиду натрію до 0,1н;
 V_0, V_1 - об'єми вихідного розчину та аліквотної частини ,мл;
M - наважка сечовини, г.

Дослід №2. Визначення активності уреазі в рослинах.

Водну суспензію, одержану з рослинних тканин, що містять уреазу, змішують із розчином сечовини і фосфатним буферним розчином з рН = 7,0, що містить трилон Б, і інкубують протягом 5 хвилин при 20°C. Дію ферменту припиняють, додаючи до інкубаційної суміші розчин фосфорновольфрамової кислоти. При цьому одночасно осаджуються білки. Кількість амонійного нітрогену, який виділився при гідролізі сечовини, визначають колориметричним тимолгіпобромідним методом. Активність уреазі визначається в кількості мікромолів амоніаку, яка перетворюється протягом 1 хвилини при 20°C під дією ферменту, що міститься в 1 г рослинного матеріалу.

Реактиви: боби сої та іншого насіння, фосфатний буферний розчин (рН = 7,0), 5%-ного розчину сечовини, 4%-ний розчин фосфорно-вольфрамової кислоти, н-бутанолу, 4%-ного розчину тимолу, 20%-ного розчину натрій гідроксиду, розчину NaBrO_4 , 95%-ного етилового спирту.

Приготування реактивів:

Фосфатний буферний розчин з трилоном Б (рН 7,0). Кристалічний KH_2PO_4 масою 6,8 г і трилон Б масою 0,9 г розчиняють у воді, що не містить амоніаку, додають розчин натрій гідроксиду ($C=1,0$ моль/л) об'ємом 30 мл, доводять водою, що не містить амоніаку, до 500 мл, додають 1 мл хлороформу, перемішують і зберігають у добре закритій склянці.

4%-ний розчин фосфорно-вольфрамової кислоти з NaCl . Фосфорновольфрамову кислоту масою 4 г розчиняють у 50 мл води, що не містить амоніаку. Натрій хлорид масою 10 г розчиняють у 50 мл води, що не містить амоніаку. Обидва розчини зливають разом, перемішують і зберігають у добре закритій склянці.

Очищення етилового спирту. На кожні 500 мл спирту додають 25 г безводного натрій сульфату і настоюють при струшуванні протягом 1 години. Потім рідину зливають, додають 2 мл розчину сульфатної кислоти ($C(1/2) = 2$ моль/л) і відганяють, збираючи фракцію, що кипить при температурі 116-118°C.

4%-ний розчин тимолу. Зважують 4 г тимолу з точністю до 0,01 г, розтирають у фарфоровій ступці з 8 мл 20%-ного розчину натрій гідроксиду. Розчин переносять у мірну колбу на 100 мл, промивають ступку водою, що не містить амоніаку, доводять до риски і старанно перемішують. Зберігають у темній склянці в прохолодному місці не більше 3 днів.

Розчин NaBrO ($C(1/2) = 0,34$ моль/л). 20%-ний розчин натрій гідроксиду об'ємом 10 мл вносять у мірний циліндр на 100 мл, додають насиченої бромної води до 100 мл і перемішують.

Для визначення концентрації бромиду відбирають піпеткою 5 мл розчину NaBrO (набирають з допомогою груші) і вміщують у колбу для титрування, де знаходиться 5 мл 20%-ного розчину KI. Потім доливають 5 мл розчину сульфатної кислоти ($C(1/2) = 2$ моль/л), перемішують і титрують розчином $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ($C(1/2) = 0,1$ моль/л) за участі крохмалю (має витратитися не менше 17 мл розчину). Якщо розчин виявиться більшої концентрації, його розбавляють розчином NaOH ($C = 0,5$ моль/л), визначаючи необхідну кількість розчину лугу за формулою:

$$X = (A \cdot B / 17) - B,$$

де X - об'єм розчину NaOH ($C = 0,5$ моль/л), який необхідно додати для розбавлення розчину NaBrO, мл;

A - об'єм розчину $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ($C(1/2) = 0,1$ моль/л), який затрачено на титрування 5 мл розчину NaBrO, мл;

B - об'єм розчину NaBrO, який розбавляється, мл;

17 - об'єм розчину $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ($C(1/2) = 0,1$ моль/л), що еквівалентний 5 мл розчину NaBrO ($C(1/2) = 0,34$ моль/л), мл.

Для приготування бромної води в склянку зі скляною пробкою наливають 50-100 мл бромиду, 1 л дистильованої води і енергійно струшують протягом 5-10 хвилин.

Методика визначення

Подрібнені боби сої масою 0,1 г чи 0,5 г іншого насіння, що містять уреазу, ретельно розтирають у фарфоровій ступці з 3 мл фосфатного буферного розчину з $\text{pH} = 7,0$. Кашку переносять у мірний циліндр на 50 мл, змивають залишок кашки дистильованою водою і доводять об'єм у циліндрі водою до 50 мл. Отриману суспензію перемішують і, не даючи осісти, відбирають піпеткою 10 мл у пробірку, додають 2 мл 0,5%-ного розчину сечовини, перемішують і залишають на 5 хвилин при 20°C . Через 5 хвилин додають 2 мл 4%-ного розчину фосфорно-вольфрамової кислоти, перемішують і через 3-5 хвилин центрифугують, зливають прозорий розчин у пробірку.

Для визначення утвореного амонійного нітрогену відбирають від 1 до 10 мл центрифугату залежно від очікуваної кількості нітрогену (при дослідженні бобів сої – 1 мл), вносять у широку пробірку, додають дистильовану воду до 10 мл, 0,5 мл н-бутанолу і струшують до розчинення спирту. Потім доливають 2 мл 4%-ного розчину тимолу і перемішують. Якщо з'являється помутніння чи осад, його розчиняють 1-2 краплями 20%-ного розчину натрій гідроксиду. До суміші додають 3 мл розчину NaBrO_4 , перемішують перевертанням пробірки і залишають на 10 хвилин. Після цього додають 3 мл н-бутанолу, струшують і залишають на 10-15 хвилин для розділення фаз. Нижній водний шар видаляють, відсмоктуючи піпеткою. Забарвлений спиртовий розчин переносять у мірний циліндр на 10 мл. Якщо розчин мутний, додають 10 крапель 95%-ного етилового спирту. Потім розчин розбавляють н-бутанолом до 5 мл, перемішують і вимірюють оптичну густину при 660 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм, порівнюючи з контрольним розчином.

Для приготування контрольного розчину в пробірку вносять 10 мл досліджуваної суспензії, додають 2 мл розчину фосфорно-вольфрамової кислоти, 2 мл 0,5%-ного розчину сечовини, струшують, через 5 хвилин центрифугують і центрифугат зливають у пробірку. Відбирають таку ж кількість центрифугату, як і в досліді, доводять дистильованою водою до 10 мл і далі виконують такі ж операції, як і з досліджуваним розчином.

Примітка:

За даними оптичної густини за калібрувальним графіком знаходять вміст нітрогену (в мкг/см³) і розраховують активність уреазі за формулою:

$$A = V_1 \cdot V_2 \cdot V_3 \cdot C / \mu \cdot t \cdot V_4 \cdot V_5 \cdot m,$$

де А – активність уреазі в мкмоль амонійного нітрогену, що утворився протягом 1 хвилини при 20оС при дії ферменту з 1г рослинного матеріалу;

V₁ – загальний об'єм ферментного екстракту, мл;

V₂ - об'єм рідини після інкубації і осадження білків фосфорно-вольфрамовою кислотою, мл;

V₃ - об'єм забарвленого бутанольного розчину, який підготовлений до колориметрування, мл;

С – вміст нітрогену в мкг в 1 мл бутанольного розчину, взятого для колориметрування;

μ - мікромоль амонійного нітрогену (14 мкг/моль);

t – тривалість ферментативної реакції, хв.;

V₄ - об'єм центрифугата, взятий для взаємодії з сечовиною, мл;

V₅ - об'єм ферментного екстракту, взятого для взаємодії з сечовиною, мл;

m – маса рослинного матеріалу, взятого для дослідження, г.

Побудова калібрувального графіка. У пробірки вносять послідовно 0,5;1;2;3;4;5;6;8;10 м стандартного розчину амоній сульфату, що містить 10 мкг нітрогену в 1 мл розчину, і доводять об'єм розчинів безамонійною водою до 10 м. В одну з пробірок додають 10 мл такої ж води для отримання контрольного розчину. Потім у всі пробірки додають по 0,5 мл н-бутанолу, струшують, додають по 2 мл 4%-ного розчину тимолу, перемішують. Далі додають по 3 мл розчину NaBrO, знову перемішують перевертанням пробірок і залишають на 10 хвилин. Після цього додають по 3 м бутанолу, струшують і залишають на 10-15 хвилин для розділення фаз. Нижній шар видаляють, відсмоктуючи піпеткою, а спиртовий розчин, забарвлений у зелений колір, переносять у мірний циліндр на 5 або 10 мл. розчини доводять бутанолом до 5 мл і вимірюють оптичну густину при 660 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм, порівнюючи з контрольним розчином. За отриманими значеннями будують калібрувальний графік.

Лабораторна робота № 2. «Дослідження тирозинази».

Тирозиназа (КФ 1.14.18.1) каталізує перетворення тирозину в меланін (пігмент чорного кольору). Проміжні продукти забарвлені в червоний колір.

Реактиви: препарат тирозинази (10 г подрібненої картоплі розтирають у ступці з 30 мл води й фільтрують крізь два шари марлі), насичений розчин тирозину.

Обладнання: фарфорова ступка з товкачиком, пробірки, піпетки, водяна баня, термостат (40°C).

Методика визначення

У дві пробірки (досліджувана проба та контроль) наливають по 1 мл препарату тирозинази. Вміст контрольної пробірки кип'ятять 3 хв і охолоджують. Потім у кожен пробірку додають по 0,5 мл насиченого розчину тирозину й ставлять у термостат за температури 40 °C на 20 хвилин. Кожні 5 хв пробірки струшують.

У пробірці з активною тирозиназою рідина поступово забарвлюється у рожевий, бурий і червоний кольори. У контрольній пробірці зміни кольору не спостерігається.

Після проведення досліду потрібно оформити протокол лабораторної роботи. Для цього одержані результати заносять до таблиці, роблять висновки.

Лабораторна робота № 3 «Дослідження сахарози».

Сахараза (КФ 3.2.1.26) каталізує гідроліз сахарози до глюкози та фруктози. Глюкозу, що утворюється під час гідролізу, можна визначити за реакцією Фелінга.

Реактиви: препарат сахарози (5 г пивних дріжджів розтирають у фарфоровій ступці з 2-3 мл дистильованої води та невеликою кількістю скляного піску, додають 8-10 мл води та фільтрують крізь ватний фільтр), 2%-й розчин сахарози, реактив Фелінга, який складається з двох розчинів – перед використанням змішують рівні об'єми цих розчинів.

Обладнання: пробірки, піпетки, фарфорова ступка з товкачиком, лійки, термостат, водяна баня, газовий пальник.

Методика визначення

У дві пробірки (досліджувана проба та контрольна) наливають по 1 мл препарату ферменту. Вміст контрольної пробірки кип'ятять протягом 3 хв для руйнування сахарози, після чого в обидві охолоджені пробірки додають по 3 мл розчину сахарози, добре перемішують і ставлять у термостат за температури 38°C. Через 15 хвилин у пробірки вносять по 2 мл реактиву Фелінга, перемішують і нагрівають до кипіння.

У контрольній пробірці осаду немає, а в пробірці з активним ферментом (дослід) утворюється червоний осад.

Після проведення досліду потрібно оформити протокол лабораторної роботи. Для цього одержані результати заносять до таблиці, роблять висновки.

Лабораторна робота № 4 «Вивчення впливу фізико-хімічних факторів на активність ферментів (на прикладі α -амілаза слини)».

В присутності α -амілази (КФ 3.2.1.1) крохмаль гідролізується до похідних (декстринів та мальтози), що не дають кольорової реакції із йодом. При взаємодії крохмалю з йодом утворюється забарвлений комплекс, оптична щільність якого за 640 нм пропорційна концентрації негідролізованого крохмалю. Активність α -амілази оцінюють за зменшенням інтенсивності забарвлення. Зміни інтенсивності забарвлення йод-крохмального комплексу пропорційні активності ферменту в дослідній пробі.

Швидкість розщеплення крохмалю під дією амілази залежить від температури та рН, й визначається за інтенсивністю забарвлення розчину крохмалю або продуктів його перетворення з йодом.

Реактиви: субстратно-буферний розчин готують змішуванням буферу (рН $7,0 \pm 0,1$) і розчину крохмалю у співвідношенні 24:1. Субстратно-буферний розчин стабільний протягом 15 діб за температури 2-8°C; розчин йоду 0,01 N готують розведенням 0,1 N розчину йоду дистильованою водою в 10 разів (розчин готують перед проведенням реакції); розчин інгібітору (0,1 N хлоридної кислоти), фізіологічний розчин.

Обладнання: пробірки, піпетки, лійки, термостат, водяна баня, фотоколориметр або СФ.

Методика визначення

Для досліду беруть 4 пробірки: три для досліду і одну для холостої проби. Слину (попередньо розведену у 10 разів) розливають у три дослідні пробірки.

Першу пробірку із 1-2 мл досліджуваного розчину слини занурюють на 5 хвилин у водяну баню з температурою 70- 80°C. Після цього проводять реакцію (див. таблицю нижче). Вимірюють оптичну щільність та розраховують активність ферменту α -амілази.

До другої пробірки із 1-2 мл досліджуваного зразка розчину слини додають 0,3-0,5 мл концентрованої хлоридної кислоти. Після цього проводять реакцію аналогічно схемі.

У третій пробірці залишається не дезактивований фермент. Зміни інтенсивності забарвлення йод-крохмального комплексу пропорційні активності ферменту в дослідній пробі. За умов дезактивації α -амілази слини різними чинниками крохмаль не гідролізується до похідних та дає кольорову реакцію із йодом.

Таблиця 10.

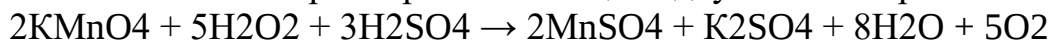
Схема проведення досліду

Компонент суміші	Холоста проба, мл	Дослідна проба 1 (після прогрівання), мл	Дослідна проба 2 (після додавання кислоти), мл	Дослідна проба (не дезактивований фермент), мл
Субстратно-буферний розчин	0,5	0,5	0,5	0,5
Інкубують 5 хвилин за 37°C.				
Розчин слини	-	0,01	0,01	0,01
Інкубують точно 5 хвилин за 37°C!!!				
Розчин хлоридної кислоти	4,5	4,5	4,5	4,5
Розчин йоду	0,05	0,05	0,05	0,05
Розчин слини	0,01	-	-	-

Оптичну густину проб: дослідних та холостої вимірюють окремо проти дистильованої води при 640 нм. Забарвлення стійке протягом 10 хвилин.

Лабораторна робота № 5 «Визначення активності каталази».

Каталаза (КФ 1.11.1.6) розщеплює пероксид водню на воду та молекулярний кисень. Метод визначення активності каталази ґрунтується на визначенні кількості пероксиду водню, що залишилася після дії на нього каталази, титруванням розчину KMnO_4 у кислому середовищі. Активність каталази визначають титриметрично. Реакція відбувається за рівнянням:



Реактиви: препарат каталази; 10 %-й розчин H_2SO_4 ; 1%-й розчин H_2O_2 на фосфатному буфері рН 7,0 (35,0 мл 0,2 моль/л Na_2HPO_4 і 13,6 мл 0,2 моль/л NaH_2PO_4); 0,1 н. розчин KMnO_4 .

Обладнання: мірні колби, бюретка, хімічні склянки, пробірки, піпетки, фарфорова ступка, кварцовий пісок, лійка, паперові фільтри, бюкси, центрифуга, термостат.

Методика визначення

Препарат каталази готується наступним чином: 20 г картоплі нарізають на шматочки, розтирають у фарфоровій ступці з невеликою кількістю кварцового піску, настоюють у 100 мл води протягом 30 хв і центрифугують.

В дві колби наливають по 5 мл препарату (центрифугату картоплі) каталази, в одну з них (контрольна проба) додають 3 мл розчину H_2SO_4 . Потім в обидві колби вносять по 10 мл розчину пероксиду водню та ставлять у термостат за температури 37 °С. Через 30 хв у другу колбу (досліджувана проба) додають 3 мл H_2SO_4 і титрують вміст обох колб (спочатку контрольної) розчином KMnO_4 до появи стійкого рожевого забарвлення від надлишку KMnO_4 . Про активність каталази судять за кількістю міліграмів пероксиду водню, що розщепився протягом 30 хв ферментом, що міститься в 1 г досліджуваного матеріалу.

Розрахунок:

Беремо до уваги, що 1 мл 0,1 н. розчину KMnO_4 відповідає 1,7 мг H_2O_2 . Активність каталази визначають за кількістю H_2O_2 , що розклався, і розраховують за формулою:

$$A_k = \frac{(A - B) \times 1,7}{n}$$

де: A_k – активність каталази;

A – кількість 0,1 н. розчину KMnO_4 , яка витрачається на титрування контрольної проби, мл;

B – кількість 0,1 н. розчину KMnO_4 яка витрачається на титрування дослідної проби, мл;

n – наважка досліджуваного матеріалу в пробі, що титрується, г.

Після проведення досліду потрібно оформити протокол лабораторної роботи. Для цього одержані результати заносять до таблиці, роблять висновки.

Лабораторна робота № 6 «Визначення активності пероксидази».

Пероксидаза (КФ 1.11.1.7) каталізує окиснення багатьох органічних сполук: фенольні сполуки, цитохром с, нітроти, аскорбінова кислота, індоліламін, гідрохінони та їх аміни. Метод визначення активності пероксидази заснований на визначенні швидкості реакції окиснення бензидину до утворення продукту окиснення синього кольору.

Реактиви: рослинний матеріал, ацетатний буфер (рН=5,4), дистильована вода, 1%-й розчин пероксиду водню, бензидин. Обладнання: мірні колби, хімічні склянки, пробірки, піпетки, фарфорова ступка, кварцовий пісок, лійка, паперові фільтри, бюкси, ФК, центрифуга, водяна баня, термометр.

Методика визначення

Наважку рослинного матеріалу масою 200-500 мг розтирають у фарфоровій ступці з водою або ацетатним буфером рН=5,4 і переносять у мірну колбу на 50 мл. Після 10 хв настоювання витяжку центрифугують за 4000 об/хв. Для визначення активності в дві кювети з довжиною оптичного шляху 10 мм кожна наливають по 2 мл ферментативної витяжки (центрифугату), 2 мл буферного розчину та 2 мл бензидину. Вимірюють оптичну густину дослідних проб проти контрольної. Вимірювання проводять за довжини хвилі 590 нм. В контрольну кювету доливають 2 мл води, а в дослідну – 2 мл 0,3%-го пероксиду водню з піпетки з широким отвором. Після цього фіксують зміну оптичної густини через кожні 10 с протягом 60 с. Активність пероксидази визначають в одиницях оптичної густини на 1 г сирової маси досліджуваного матеріалу за хвилину.

Тема 10. Біотехнологічне виробництво гормонів.

Лабораторна робота. Якісні реакції на гормони.

За допомогою якісних реакцій можна визначити наявність гормонів різної природи у пробі.

Реактиви: штатив для пробірок, пробірки, піпетки, електрична плитка, азбестова сітка; дистильована вода, розчин адреналіну (1:1000), розчин інсуліну (в ампулах), 3%-й розчин ферум (III) хлориду, 10%-й розчин натрій гідроксиду, діазореактив (або 1%-а сульфанілова кислота та 5%-й розчин натрій нітриту), 10%-й розчин натрій карбонату; 10%-й розчин натрій гідроксиду, 1%-й розчин купрум сульфату, 5%-й розчин плюмбум ацетату, 20%-й розчин сульфосаліцилової кислоти.

Методика визначення

Дослід 1. Якісні реакції на адреналін

Принцип реакції. Реакції ґрунтуються на утворенні забарвлених продуктів під час окиснення адреналіну в пробі.

а) реакція з ферум (III) хлоридом

У пробірку вносять 0,5-1 мл розчину адреналіну (1 : 1000), додають 1-2 краплі 3%-го розчину ферум (III) хлориду, перемішують. Спостерігають появу смарагдово-зеленого забарвлення. Далі додають 1 краплю 10%-го розчину натрій гідроксиду – з'являється вишнево-червоне забарвлення, а потім коричневе.

б) реакція з діазореактивом

До 0,5 мл діазореактиву (або до 0,5 мл 1%-ої сульфанілової кислоти додають 0,5 мл 5%-го розчину натрій нітриту – утворюється діазореактив) додають 0,5 мл розчину адреналіну (1 : 1000), 0,5 мл 10%-го розчину натрій карбонату, перемішують. Розчин забарвлюється у *червоний колір*.

Дослід 2. Якісні реакція на інсулін

а) біуретова реакція на інсулін

Принцип реакції. У лужному середовищі поліпептиди утворюють комплексні солі Купруму, які мають фіолетове забарвлення. Біуретова реакція підтверджує білкову природу інсуліну, що містить пептидний зв'язок.

Хід роботи. До 5 крапель розчину інсуліну додають 5 крапель 10%-го розчину натрій гідроксиду та 1 краплю 1%-го розчину купрум сульфату. Перемішують, струшують. Спостерігають появу фіолетового забарвлення. Роблять висновки про пептидну природу інсуліну.

б) реакція на залишки сульфуровмісних амінокислот в інсуліні (реакція Фоля)

Принцип реакції. Реакція ґрунтується на взаємодії сульфуровмісних амінокислот з лугами при нагріванні. При цьому від амінокислот відщеплюється Сульфур у вигляді гідроген сульфіді, який виявляють за допомогою реакції з плюмбум ацетатом.

Хід роботи. До 5 крапель розчину інсуліну додають 5 крапель 10%-го розчину натрій гідроксиду, нагрівають до кипіння. Потім додають 2-3 краплі 5%-го розчину плюмбум ацетату. Спостерігають появу коричневого або чорного забарвлення. Роблять висновок про вміст цистину, цистеїну в складі інсуліну, а також відмічають значення дисульфідних зв'язків у його структурі.

в) реакція на інсулін із сульфосаліциловою кислотою

Принцип реакції. Реакція ґрунтується на взаємодії інсуліну з розчином сульфосаліцилової кислоти з утворенням осаду білого кольору.

Хід роботи. До 1 мл розчину інсуліну, додають 5 крапель 20%-го розчину сульфосаліцилової кислоти. Спостерігають утворення *білого осаду*.

Результати дослідів 1-2 запишіть у таблицю 15 за аналогією:

Якісні реакції на гормони

№ з/п	Назва реакції	Реактиви, які використовувалися	Зміни, що відбулися під час реакції	Висновок
1	2	3	4	5
1	Якісна реакція на адреналін а) реакція з ферум (III) хлоридом	1) 0,5 мл-1 мл розчину адреналіну (1 : 1000); 2) 1-2 краплі 3%-го розчину ферум (III) хлориду. Перемішують. 4) 1 краплю 10%-го розчину натрій гідроксиду	З'являється смарагдово-зелене забарвлення, потім – вишнево-червоне і зрештою – коричневе.	Якісна реакція на адреналін

За результатами лабораторної роботи зробіть загальний висновок.

Тема 11. Промислове отримання антибіотиків.

Лабораторна робота №1.

Тема роботи: «Методи аналізу антибіотиків».

Величину активності антибіотиків (протибактеріальної, антифунгальної і т.ін.) зазвичай виражають в умовних одиницях, що містяться в 1 мл розчину (од./мл) чи в 1мг препарату (од./мг). За *одиницю антибіотичної активності*

приймають мінімальну кількість антибіотика, здатну пригнічувати розвиток чи затримувати ріст певної кількості клітин стандартного штаму тест-мікроба в одиниці об'єму поживного середовища.

Після отримання антибіотиків в хімічно чистому вигляді з'явилася можливість для низки антибіотиків виразити умовні одиниці біологічної активності в одиницях маси. Встановлено, наприклад, що 1 мг чистого стрептоміцину еквівалентний 1000 од. біологічної активності. Відповідно 1 од. активності даного антибіотика еквівалентна 1мкг чистого стрептоміцину. Тому на сьогодні кількість стрептоміцину та багатьох інших антибіотиків виражають в мкг/мл чи мкг/мг.

Зрозуміло, що одиниця біологічної активності не завжди співпадає з 1 мкг. Наприклад, для бензилпеніциліну 1од. еквівалентна приблизно 0,6 мкг, тобто 1 мг антибіотика містить 1667 од.

Методи аналізу антибіотиків. На відміну від деяких інших природних сполук (алкалоїди, глікозиди) для антибіотиків не існує загальних групових реакцій. Такі реакції можуть бути використані лише для антибіотиків одного

хімічного класу, наприклад для тетрациклінів чи нітрофенілалкіламінів (левоміцетинів).

Для ідентифікації антибіотиків можуть бути використані різні кольорові реакції на відповідні функціональні групи; спектральні характеристики у видимій, УФ та ІЧ частинах спектру; хроматографічні методи.

Для кількісного визначення антибіотиків використовують біологічні, хімічні і фізико-хімічні методи.

Біологічні методи базуються на безпосередньому біологічному впливі антибіотика на відповідний тест-організм, чутливий до дії антибіотика. При цьому може бути використано метод дифузії, що базується на здатності молекул антибіотиків дифундувати в агарових середовищах. Оцінюється розмір зони, в якій тест-організм не росте. Цей розмір, за стандартизованих умов проведення досліду, пропорційний концентрації антибіотика.

В основу іншої різновидності біологічних методів визначення кількості антибіотика покладено турбідиметрію – метод кількісного аналізу за інтенсивністю світла, що поглинається зваженими частинками – клітинами мікроорганізму. При додаванні певної кількості антибіотику до рідкого поживного середовища спостерігається затримка росту клітин тест-штаму мікроорганізму, при цьому змінюється інтенсивність поглинання світла.

Для кількісного визначення антибіотиків використовують різні спектральні методи – в першу чергу фото колориметричний та спектрофотометричний методи. Наприклад, для визначення концентрації розчину еритроміцину можна використати фото колориметричний метод, що ґрунтується на зміні абсорбції розчину антибіотика після взаємодії з сірчаною кислотою. Антибіотики тетрациклінового ряду можуть бути визначені спектрофотометричним методом за половою поглинання, що зникає після лужного гідролізу діючої речовини.

Дослід 1. Метод визначення кількості пеніцилінів

Найпоширеніший метод хімічного визначення кількості пеніцилінів – йодометричне титрування, що ґрунтується на різному відношенні пеніцилінів і пеніцилінових кислот до йоду. З йодом взаємодіють лише пеніцилінові кислоти, які утворюються з пеніцилінів у результаті розриву їх β -лактамного кільця під впливом лугів.

За різницею між кількістю йоду, яку було витрачено на титрування розчину до і після інактивації пеніцилінів, можна зробити висновок про кількість антибіотиків пеніцилінового ряду, що містяться у досліджуваних розчинах або препаратах.

Реактиви. Препарат пеніциліну; 1 н. розчин гідроксиду натрію; 1 н. розчин соляної кислоти; 0,01 н. розчин йоду; 0,01 н. розчин тіосульфату натрію; 0,3 м розчин ацетатного буфера рН 4,5 (17,5 г ацетату натрію і 10,3 г льодяної оцтової кислоти розчиняють у дистильованій воді у мірній колбі на 1 л і об'єм доводять до риски); 1%-й розчин крохмалю.

Методика визначення

Точну наважку препарату (0,06 – 0,1 г) розчиняють у 100 мл дистильованої води у мірній колбі. 5 мл розчину переносять у конічну колбу з

притертою пробкою місткістю 250 мл, додають 2 мл 1 н. розчину NaOH і залишають на 20 хв для інактивації пеніцилінів. Після цього до суміші додають 2 мл 1 н. розчину соляної кислоти, 5 мл 0,3 М розчину ацетатного буферу (рН 4,5), 20 мл розчину йоду (0,01 н.) і залишають на 20 хв у темному місці. Надлишок йоду відтитровують 0,01 н. розчином тіосульфату натрію до ледь жовтого кольору, потім додають розчин крохмалю і титрують до знебарвлення.

У контрольну пробу переносять 5 мл розчину пеніциліну, додають 5 мл 0,3М розчину ацетатного буферу (рН 4,5) та 20 мл розчину йоду і залишають на 20 хв у темному місці, після чого надлишок йоду відтитровують 0,01 н. розчином тіосульфату натрію, як зазначено вище.

Різниця в об'ємах між титруванням відповідає вмісту суми пеніцилінів у препараті.

Вміст суми пеніцилінів у препараті розраховується за формулою:

$$X = \frac{e \cdot V \cdot V_r}{a \cdot 5} \cdot 100\%$$

де V – різниця в об'ємах 0,01 н. розчину тіосульфату натрію між контрольним і дослідним титруванням, мл; V_r – об'єм води, в якому розчиняли наважку антибіотика, мл; e – розмір еквівалента (1 мл 0,01 н. розчину йоду у грамах стандартного зразка натрієвої солі бензилпеніциліну в перерахунку на хімічно чисту речовину при температурі 20 °С, e=0,0004055); a – наважка препарату, г.

Дослід 2. Метод визначення кількості хлортетрацикліну

Колориметричний метод визначення вмісту хлортетрацикліну в препаратах і культуральній рідині ґрунтується на вимірюванні оптичної густини його розчину після кип'ятіння з 2 н. соляною кислотою. Під час кип'ятіння розчину хлортетрацикліну в кислому середовищі з'являється жовте забарвлення, зумовлене наявністю продуктів гідролізу хлортетрацикліну. Густина забарвлення вимірюють на фотоелектроколориметрі і за калібрувальним графіком визначають відповідну концентрацію хлортетрацикліну.

Реактиви: 0,01н і 2н розчини соляної кислоти; стандарт – кристалічний солянокислий хлортетрациклін; індикатор тимолблау.

Побудова калібрувального графіка

Калібрувальний графік будують за стандартним розчином хлортетрацикліну.

Наважку солянокислого хлортетрацикліну беруть з таким розрахунком, щоб отримати розчин в 0,01 н. соляній кислоті з вмістом хлортетрацикліну 1 мг/мл (1000 од/мл). Розведенням цього основного розчину готують серію розчинів, які містять 200 – 1000 од/мл.

У дві мірні колби на 50 мл переносять по 1 мл розчину хлортетрацикліну відповідного розведення. В одну з колб додають 5 мл 2 н. розчину соляної кислоти (дослід), а в другу – 5 мл дистильованої води (контроль). Обидві колби на 5 хв занурюють у киплячу водяну баню, а потім негайно охолоджують. До контрольної проби додають 5 мл 2 н. розчину соляної кислоти і в обох колбах об'єм доводять водою до риски. Після ретельного

перемішування контрольний розчин розливають у дві кювети, а дослідний розчин – у третю кювету і вимірюють оптичну густину досліджуваного розчину проти контролю на ФЕК з синім світлофільтром.

Калібрувальний графік будують, відкладаючи отримані значення оптичної густини на осі ординат, а відповідні їм концентрації хлортетрацикліну (од/мл) – на осі абсцис.

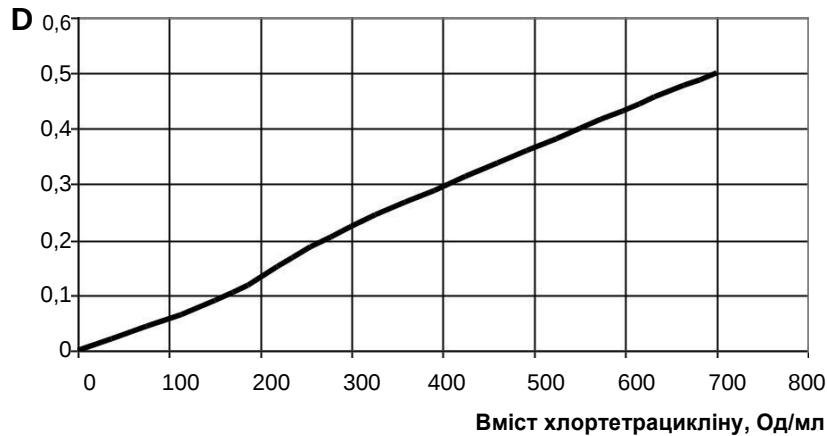


Рис. 5. Залежність оптичної густини від вмісту хлортетрацикліну

Методика визначення

Досліджувані препарати біоміцину розчиняють і проводять у них потрібні визначення так, як для побудови калібрувального графіка.

Для аналізу культуральної рідини продуцента біоміцину зразки культуральної рідини попередньо підкислюють кількома краплями концентрованої соляної кислоти до рН 2,0 – 2,5 з індикатором тимолблау і витримують протягом 20 хв, після чого відфільтровують через паперовий фільтр від міцелію і аналізують точно так, як під час побудови калібрувального графіка.

Лабораторна робота №2.

Тема роботи: «Біологічні методи визначення кількості антибіотиків».

Активність антибіотиків визначають шляхом порівняння ступеня пригнічення росту чутливих мікроорганізмів у результаті дії випробовуваного антибіотика та стандартного зразка у відомих концентраціях.

Стандартні зразки для кількісного визначення є речовинами з точно встановленою концентрацією відповідно до міжнародного стандартного препарату.

Чутливість мікроорганізмів до дії антибіотиків. Дослідженню на чутливість до антибіотиків підлягають чисті культури мікроорганізмів або ізольовані колонії із щільних поживних середовищ первинного посіву клінічного матеріалу. Визначення чутливості з використанням клінічного матеріалу (без виділення чистої культури) можливо тільки у виключних

випадках за умови підтвердження однорідності культури і високого ступеня обсіменіння при мікроскопії мазків забарвлених за Грамом. При такій ситуації дослідження слід повторити після виділення чистої культури мікроорганізму.

Серед стандартизованих методів визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків розрізняють методи серійних розведень та дифузійні. Крім того, в даний час все більш широкого розповсюдження набувають автоматичні методи.

Методи серійних розведень базуються на прямому визначенні мінімальної інгібуючої (подавляючої) концентрації (МІК) препарату, що характеризує мікробіологічну активність антибіотика.

МІК - мінімальна концентрація препарату, яка пригнічує видимий ріст досліджуваного мікроорганізму в бульйонній культурі або на щільному поживному середовищі.

Для визначення величини МІК певні концентрації антибіотика вносять у поживне середовище, яке потім засівають культурою досліджуваного мікроорганізму і після інкубації оцінюють наявність або відсутність видимого росту.

Розрізняють методи серійних розведень в агарі або в бульйоні. В залежності від об'єму використаного бульйону, розрізняють методи серійних макро- і мікророзведень. В автоматизованих системах для визначення чутливості мікроорганізмів використовується метод, заснований на використанні тільки двох концентрацій антибіотика, які відповідають граничним значенням МІК.

Метод дифузії. В основу дифузійних методів визначення чутливості покладена дифузія антибіотика із носія у щільне поживне середовище до концентрації препарату, яка перевищує МІК, і пригнічує ріст досліджуваної культури в цій зоні. Існують дві основні модифікації дифузійного методу: **диско-дифузійний та Е-тест.**

В **диско-дифузійному методі** у якості носія антибіотика використовують паперовий диск (Табл.1.2). Утворення зони пригнічення росту відбувається в результаті дифузії антибіотика з носія в поживне середовище. Диско-дифузійний метод дозволяє лише опосередковано зробити висновок про величину МІК, а

результатом дослідження є віднесення мікроорганізму до однієї з категорій чутливості (чутливий, помірно-стійкий або резистентний).

Мікроорганізм є чутливим до даного антибіотика в тому випадку, коли у нього немає механізмів резистентності до антибіотика і при лікуванні стандартними дозами антибіотика інфекцій, викликаних цим мікроорганізмом, відмічається добра терапевтична ефективність.

Мікроорганізм вважають помірно резистентним, якщо пригнічення його росту відбувається лише за використання великих доз антибіотика. При лікуванні хвороб, спричинених таким мікроорганізмом добра терапевтична ефективність спостерігається лише за використання високих терапевтичних доз антибіотика та при локалізації інфекції в місцях, де антибіотик накопичується у високих концентраціях.

Мікроорганізм вважається резистентним до даного антибіотика, якщо він має механізми стійкості до останнього та його ріст не пригнічують навіть дуже великі дози антибіотика. При лікуванні захворювань спричинених таким мікроорганізмом не відмічають терапевтичного ефекту навіть при використанні максимальних терапевтичних доз антибіотика.

Таблиця 12.

Вміст антибіотиків у стандартних дисках для визначення чутливості мікроорганізмів

Назва	Кількість в диску	Назва	Кількість в диску
Ампіцилін	10 мкг	Ріфампіцин	5 мкг
Гентаміцин	10 мкг	Стрептоміцин	30 мкг
Ерітроміцин	15 мкг	Тетрациклін	30 мкг
Канаміцин	30 мкг	Фурадонін	300 мкг
Левоміцетин	30 мкг	Фуразолідон	300 мкг
Лінкоміцин	15 мкг	Цефазолін	30 мкг
Оксациллін	10 мкг	Цефотаксим	30 мкг
Олеандоміцин	15 мкг	Цефтриаксон	30 мкг
Пеніцилін	10 ОД	Цефуроксим	30 мкг
Поліміксин	300 ОД		

Е-тест - це вузька полімерна смужка (0,5 x 6,0 см), на яку нанесений градієнт концентрацій антибіотика (від мінімальних до максимальних). Пригнічення росту мікроорганізму навкруги смужки Е-тесту відбувається тільки в тій зоні, де концентрація антибіотика, що дифундує з носія, вище МІК, при цьому утворюється краплеподібна зона інгібування (рис.6.).

Значення концентрацій антибіотика на кожній ділянці носія нанесені на зовнішній (звернений до дослідника) поверхні Е-тесту. Величину МІК враховують в тому місці, де межа зони пригнічення росту впритул підходить до носія. Детальні інструкції про визначення чутливості з використанням Е-тестів додаються виробником до набору.

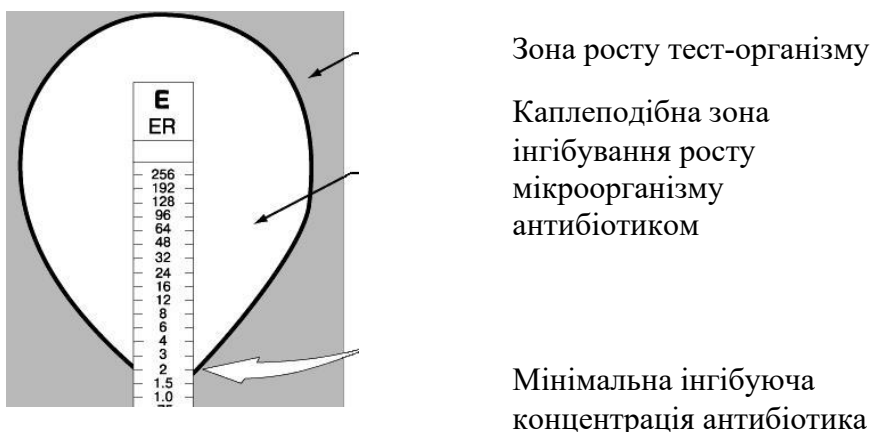


Рис.6. Е-тест для визначення чутливості мікроорганізмів до дії антибіотиків

Основні етапи проведення тестування. Для вивчення антибіотикочутливості мікроорганізму, незалежно від методу дослідження, необхідно послідовно виконати такі етапи:

- приготувати поживні середовища;
- приготувати суспензії досліджуваних мікроорганізмів (інокулюма);
- внести інокулюм в поживне середовище;
- інкубувати посіви визначений проміжок часу при відповідних температурних параметрах;
- облік результатів та їх інтерпретація, формулювання рекомендацій щодо лікування.

Дифузійні методи включають також етап накладення дисків або смужок Е-тесту на щільне поживне середовище.

Диско-дифузійний метод (ДДМ). Метод оснований на здатності антибіотиків дифундувати з просочених ними паперових дисків в поживне середовище і пригнічувати ріст мікроорганізмів посіяних на поверхні агару.

Щільне поживне середовище розливають у чашки Петрі шаром товщиною 4,0 +/- 0,5 мм, попередньо виставивши їх на горизонтальну поверхню (вивірену рівнем, без западин і опуклостей). Це вкрай важливо, оскільки розмір і форма зони пригнічення росту залежать від глибини і рівномірності агарового шару. Чашки залишають при кімнатній температурі для застигання. Зберігати чашки можна запаяними в поліетиленові пакети при 4-8°C протягом 5 діб. Перед інокуляцією чашки підсушують у термостаті при 35°C з привідкритою кришкою протягом 10-20 хв. Конденсату рідини на внутрішній поверхні кришок не повинно бути. Для визначення чутливості використовують тільки стандартизовані якісні диски з антибіотиками. Виготовлення дисків з антибіотиками для визначення чутливості диско-дифузійним методом в лабораторних умовах не допускається.

Достовірність результатів дослідження залежить також від умов зберігання готових комерційних дисків, оскільки вміст в них антибіотиків може знизитися нижче допустимого рівня до закінчення терміну придатності. Зберігати диски з антибіотиками тривалий термін слід в герметичній упаковці в морозильній камері при температурі -18 °C і нижче. Невеликі партії дисків, що використовуються в повсякденній роботі, можна тримати в холодильнику при температурі 4-8 °C, щільно закупореними, щоб гарантувати неможливість попадання у флакон вологи, крім того, для додаткового захисту від вологи флакони (картриджі) з дисками комерційного виготовлення містять спеціальний вологопоглинач (силікагель). Флакони (картриджі) з дисками слід витримувати перед використанням герметично закритими до досягнення ними кімнатної температури протягом 1 години, що запобігає утворенню конденсату на дисках після відкриття флаконів.

При визначенні чутливості ДДМ використовують стандартний інокулюм, що містить $1,5 \times 10^8$ КУО/мл. Інокулюм слід використовувати протягом 15 хвилин з моменту приготування.

На поверхню поживного середовища наносять диски з антибіотиками. Аплікацію дисків проводять за допомогою стерильного пінцета або автоматичного диспенсера. Відстань від диска до краю чашки і між дисками повинна бути 15-20 мм, тобто на одну чашку діаметром 100 мм слід поміщати не більше 6 дисків з антибіотиками. Диски повинні рівномірно контактувати з поверхнею агару, для чого їх слід акуратно притиснути пінцетом.

Відразу після аплікації дисків чашки Петрі поміщають в термостат догори дном і інкубують при температурі 35 °С протягом 18-24 год. (в залежності від виду досліджуваного мікроорганізму). Збільшення інтервалу часу між нанесенням дисків на поверхню середовища і початком інкубації, а отже і початком росту досліджуваної культури, приводить до "передифузії антибіотика" в агар і до збільшення діаметра зони пригнічення росту.

Тема 12. Технологічне вирішення біотехнологічних виробництв.

Лабораторна робота.

Тема роботи: «Складання технологічних блок-схем з режимами біопроцесів».

Мета роботи: навчитися складати технологічні блок-схеми з режимами біопроцесів.

Теоретичні відомості

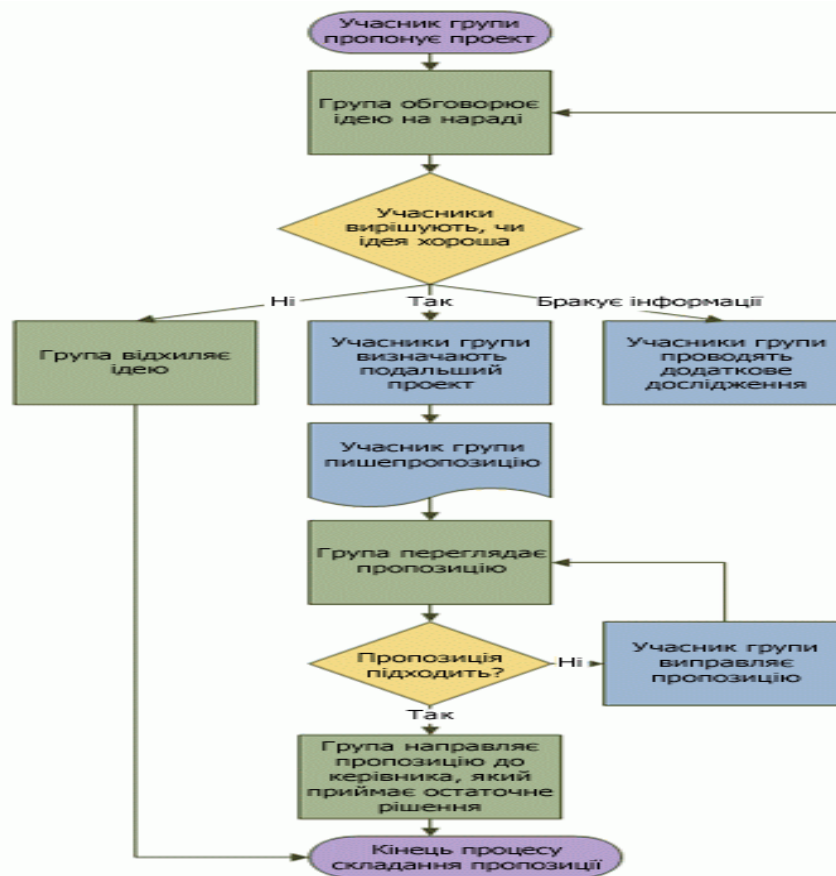
Блок-схеми – це схеми, на яких зображено етапи певного процесу. Прості блок-схеми легко створювати й легко сприймати завдяки нескладним наочним фігурам.

Сфери, для яких розробляються блок-схеми:

Сфера	Опис
Окремий харчовий продукт	Усі виробничі етапи – від приймання вхідної продукції до відвантаження готового продукту замовникові, що зручно для нескладних виробничих процесів
Група харчових продуктів	Групи можна поділити, наприклад, на супи, холодні салати, теплі салати тощо, що може стати у пригоді підприємствам громадського харчування через їхній великий асортимент страв
Послідовність технологічного процесу	• Блок-схема приймання, перевірки та зберігання вхідної сировини й матеріалів • блок-схема підготовки сировини та допоміжних матеріалів • блок-схема виробничого процесу • блок-схема зберігання готової продукції та її відвантаження Така робота з блок-схемами доречна для складних технологічних процесів та великих розгалужених підприємств

Примітка.: Просту блок-схему можна автоматично створити на основі даних за допомогою схеми Візуалізатора даних Visio.

Шаблон простої блок-схеми у програмі Visio містить фігури, за допомогою яких можна відобразити різні типи процесів. Це особливо зручно, коли потрібно відобразити основні бізнес-процеси, наприклад процес розробки пропозиції, зображений на рисунку нижче.



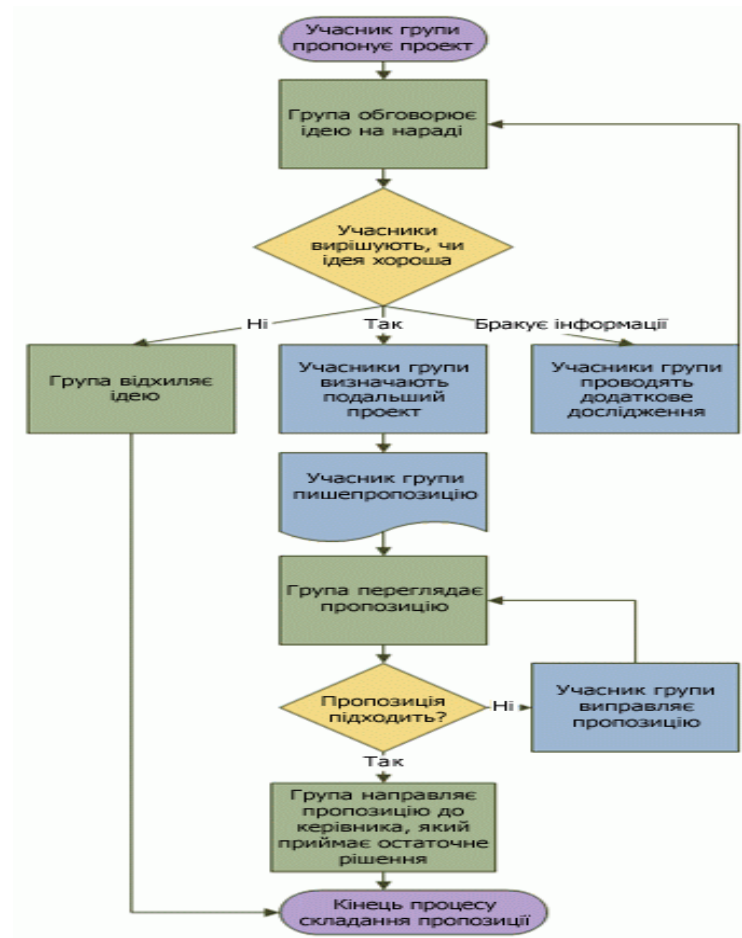
Створення блок-схеми

1. Запустіть Visio.
2. Оберіть категорію **Блок-схема**.
3. Двічі клацніть **Проста блок-схема**.
4. Перетягніть на сторінку креслення фігури блок-схеми, що відповідають кожному кроку процесу, який документується.
5. Поєднайте фігури блок-схеми, тримаючи стрілку миші над першою фігурою, а потім натиснувши маленьку стрілку, що з'явилася і показує на фігуру, яку необхідно з'єднати. Якщо друга фігура розташована на іншій сторінці, ніж інша фігура, натисніть і тримайте маленьку стрілку, тягніть її до другої фігури, і відпустіть з'єднувач на середині другої фігури.
6. Для введення тексту до фігури або сполучної лінії їх потрібно виділити. Після введення тексту клацніть будь-де в пустому місці сторінки.
7. Щоб змінити напрямок стрілки сполучної лінії, виділіть сполучну лінію, а потім на вкладці **Фігури** у групі **Стилі фігур** натисніть **Лінія**, наведіть вказівник на пункт **Стрілки** та виберіть потрібний напрямок стрілки.

Виправлення інтервалів та вирівнювання

1. Натисніть сполучення клавіш **Ctrl + A**, щоб виділити усе на сторінці креслення.
2. На вкладці **Основне** в групі **Упорядкування** натисніть кнопку **Розташування**, а потім виберіть **Автоматично вирівняти та розташувати**.

Якщо ця команда не спрацьовує, натисніть сполучення клавіш Control+Z, щоб скасувати дію, а потім спробуйте використати інші параметри під кнопками **Вирівнювання** та **Розташування**.



Призначення фігур блок-схеми

Під час відкриття шаблону **Проста блок-схема** також відкривається трафарет **Фігури простої блок-схеми**. Кожна фігура шаблону зображає окремий етап процесу. Однак, стандартне універсальне значення фігур відсутнє – будь-яка фігура може мати будь-яке значення, зрозуміле тим, хто створює і читає блок-схему. У більшості блок-схем використовується три або чотири фігури, якщо немає вагомій причини використовувати більше фігур. Проте фігури Visio мають назви, які пояснюють їхнє використання. Найпоширеніші з них наведено нижче.

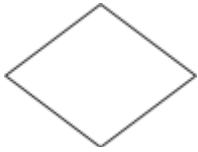
Початок/Кінець Ця фігура використовується для позначення першого та останнього кроку процесу.



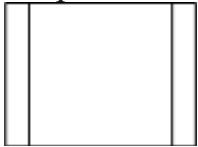
Процес Ця фігура зображає етап у процесі. Це найбільш використовувана фігура у майже усіх процесах.



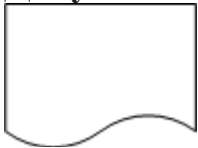
Рішення. Ця фігура позначає точку, де наступний крок залежить від результатів рішення. Можуть мати місце кілька результатів, але у більшості випадків їх тільки два – так чи ні.



Підпроцес Ця фігура використовується для позначення кількох етапів, які разом створюють підпроцес, визначений в іншому місці, часто на іншій сторінці того самого документу. Це зручно, коли схема велика та складна.



Документ. Ця фігура зображає крок, результат якого – створення документа.



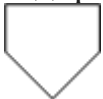
Дані. Ця фігура вказує на надходження інформації до процесу ззовні або на її вихід із процесу. Ця фігура також використовується для зображення матеріалів та інколи називається фігура «Ввід/Вивід».



Посилання в межах сторінки. Це маленьке коло вказує на те, що наступний (або попередній) крок розташований в іншому місці на цій сторінці креслення. Особливо це зручно для великих блок-схем, на яких в іншому разі довелося б використовувати довгу сполучну лінію, яку важко простежити.



Посилання на іншу сторінку. Після перетягування цієї фігури на сторінку креслення відкривається діалогове вікно, в якому можна створити набір гіперпосилань між двома сторінками блок-схеми або між фігурою підпроцесу та окремою сторінкою блок-схеми, на якій зображено кроки такого підпроцесу.



Форми контролю знань – презентація виконаних завдань у вигляді програми, презентації, обговорення виконаних завдань.

Рекомендована література

1. Боднарчук О. Конструювання заквашувальних композицій для виробництва кисловершкового масла / О. Боднарчук, Н. Слободянюк // Продовольча індустрія АПК. – 2018. – № 4. – С. 18–23.
2. Дробот В.І. Довідник з технології хлібопекарського виробництва [Текст] : навч. посіб. / В. І. Дробот. — 2-ге вид., перероб. і доп. — Київ : ПрофКнига, 2019. — 580 с.
3. Кігель Н. Ф. Вивчення біотехнологічного потенціалу селекціонованих культур молочнокислих бактерій / Н. Ф. Кігель, І. В. Мельник, О. В. Науменко // Харчова наука і технологія. – 2018. – Т. 12, вип. 4. – С. 4–9.
4. Конспект лекцій з дисципліни «Промислова та екологічна біотехнологія» для студентів очної форми навчання та після дипломної освіти зі спеціальності: 162 Біотехнології та біоінженерія першого (бакалаврського) рівня /Укладач: Корнієнко І. М. – Кам'янське: ДДТУ, 2017. 119с.
5. Костюченко Н.І. Біотехнологічні аспекти раціонального природокористування: навчальний посібник для здобувачів ступеня вищої освіти бакалавра напряму підготовки «Екологія, охорона навколишнього середовища та збалансоване природокористування» / Н.І. Костюченко. Запоріжжя: ЗНУ, 2018. 116 с.
6. Курта С. А. Промислові біотехнології : курс лекцій. ІваноФранківськ : ПНУ, 2018. 310 с.
7. Левандовський Л. В. Біотехнологія спиртової ферментації з рециркуляцією дріжджів / Л. В. Левандовський, О. П. Вітряк, М. П. Демічковська // Харчова наука і технологія. – 2019. – Т. 13, вип. 3. – С. 9.
8. Пирог Т. П. Харчова біотехнологія : підручник / Т.П. Пирог, М.М. Антонюк, О.І. Скроцька, Н.Ф. Кігель ; Міністерство освіти і науки України, Національний університет харчових технологій. - Київ : Видавництво Ліра-К, 2019. - 407 с.
9. Промислові біотехнології. Курс лекцій. Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника. Івано-Франківськ, Супрун В.П., 2018. 197с.
10. Промислова технологія лікарських засобів / Е.В. Гладух, О. А. Рубан, В. І. Чуєшов, О. О. Ляпунова // Видавництво «Новий Світ – 2000», 2020. 520 с.
11. Промислова біотехнологія : курс лекцій для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти ОПП «Біотехнології та біоінженерія» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» денної форми здобуття вищої освіти / уклад. О. І. Юлевич. Миколаїв : МНАУ, 2024. 159 с.
12. Савченко О.А., Грек О.В., Красуля О.О. Сучасні технології молочних продуктів: Підручник. – К.; ЦП «Компринт», 2018.– 218 с.

13. Фармацевтична біотехнологія: Біотехнології виробництва готових лікарських форм : навчальний посібник для студентів біотехнологічних спеціальностей / Ю. М. Краснопольський, Д. М. Пилипенко. – Харків : ТОВ «ДРУКАРНЯ МАДРИД», 2020. – 279 с.
14. Харчова біотехнологія [Електронний ресурс]: наук.-допом. бібліогр. покажч. / [упоряд. О. В. Олабоді] ; Нац. ун-т харч. технол., Наук.-техн. б-ка. – Київ, 2021. – 136 с.
15. Хімія та аналіз харчових продуктів: Лабораторний практикум. – Навчальнометодичний посібник. – Івано-Франківськ: Вид. Супрун В.П., 2019. – 105 с.
16. Юлевич О. І., Луговий С. І., Каратєєва О. І., Баркарь Є. В. Біотехнології та біоінженерія. Вступ до фаху : навчальний посібник. Миколаїв : МНАУ, 2022. 285 с.

**Штапенко Оксана Всеволодівна
Кіт Наталія Петрівна**

НАВЧАЛЬНЕ ВИДАННЯ

ПРОМИСЛОВА БІОТЕХНОЛОГІЯ
Методичні вказівки для лабораторних робіт
здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої
освіти
спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія
ОП «Біотехнології та біоінженерія»

Підписано до друку 26.11.2024 р. Формат 60х84 ^{1/16}
Папір офсетний. Тираж 100 прим.
Видавництво “Папірсу”