

Міністерство освіти і науки України
Львівський національний університет
ветеринарної медицини та біотехнологій
імені С. З. Гжицького

Кафедра біотехнології та радіології

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

до виконання лабораторних робіт
з дисципліни «Біотехнологія бродіння»

для здобувачів вищої освіти першого (бакалаврського) рівня
за освітньо-професійною програмою
«Біотехнології та біоінженерія»
зі спеціальності: G₂₁ Біотехнології та біоінженерія
галузі знань G Інженерія, виробництво та будівництво

Львів – 2025

Укладач:
к.б.н., доцент
Теодор Гривул

Рецензент:
к.х.н., доцент ЛНУ «Львівська політехніка»
Ольга Швед

Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з дисципліни «Біотехнологія бродіння» для студентів спеціальності G₂₁ Біотехнології та біоінженерія першого (бакалаврського) рівня вищої освіти усіх форм навчання розроблено на основі навчальних та робочих програм, затверджено на засіданні кафедри біотехнології та радіології (протокол № 23 від 03.03.2025 р.) та засіданні НМР факультету харчових технологій та біотехнології (протокол № 2 від 13.03.2025 р.) Укладач Т. Гривул. Львів: ЛНУВМБ ім. С. З. Гжицького, 2025. 44 с.

ЗМІСТ

Вступ	4
1. Загальні вказівки до виконання лабораторних робіт	6
1.1. Основні правила роботи та вимоги з техніки безпеки	6
1.2. Заходи з надання першої медичної допомоги при нещасних випадках	7
2. Морфофункціональна характеристика мікроорганізмів- збудників бродіння	10
2.1. Морфофункціональна характеристика дріжджів – збудників бродіння.....	10
2.2. Морфофункціональна характеристика бактерій – збудників бродіння.....	15
3. Аналіз субстратів та продуктів реакцій різних типів бродіння	22
3.1. Виявлення і визначення рівня полісахаридів, олігосахаридів та продуктів їх розщеплення в сировині та бродильних середовищах.....	23
3.2. Виявлення і визначення рівня продуктів реакцій різних типів бродіння.....	37
4. Оцінка продукції бродильних виробництв.....	41
Список використаної літератури	43

ВСТУП

Біотехнологія – це організована людиною діяльність мікроорганізмів, яка спрямована на отримання певного продукту. Історично вона виникла на основі традиційних (переважною більшістю) бродильних виробництв, адже багато з цих технологій неусвідомлено використовувалися ще в давнину.

Сучасна біотехнологія найширше використовується у харчовій промисловості і є основою виробництва багатьох харчових продуктів – хліба, вина, пива, квасу та спирту. Вирішальну роль у виробництві цих продуктів відіграють мікроорганізми – дріжджі.

В харчовій промисловості крім дріжджів широко використовуються також молочнокислі та оцтовокислі бактерії і плісені. Вони використовуються для виробництва сирів і кисломолочних продуктів, оцтової кислоти із вина та етилового спирту, молочної кислоти із глюкози, тощо.

Ці мікроорганізми різняться за будовою, розмірами, способами розмноження, реакціями з киснем, умовами росту та здатністю перетворювати різні субстрати. Всі вони подібні в тому, що активно розвиваються і синтезують ензими, за допомогою яких каталізують відповідні реакції. Живі клітини мікроорганізмів синтезують ензими двох типів – екзоензими і ендоензими. Перші діють позаклітинно на органічні субстрати – вуглеводи, білки і жири. Другі синтезуються, залишаються всередині клітин і каталізують зміни або розщеплення поживних речовин. Продукти розщеплення можуть використовуватися клітиною, або виділятися в оточуюче середовище.

Мікроорганізми бродіння знайшли широке технічне застосування завдяки тому, що вони легко культивуються, швидко розвиваються у сприятливих поживних середовищах, синтезують велике число ензимів, які здійснюють хімічні перетворення складних органічних речовин у порівняно простих виробничих умовах і зберігають при цьому фізіологічну постійність.

В даний час з технологічної точки зору розрізняють три групи бродильних виробництв:

Перша група – це виробництва, в яких використовуються дріжджі. Вони використовуються для виробництва етанолу, квасу, вина, гліцерину, хлібопекарських і кормових дріжджів.

Друга група – це виробництва, в яких використовуються бактерії. Вони використовуються для виробництва органічних розчинників – бутанолу і ацетону, а також виробництва кислот – молочної, оцтової, пропіонової і масляної.

Третя група – це виробництво, в яких використовуються плісневі гриби. Вони використовуються для виробництва цитринової, глюконової, ітаконової та фумарової кислот.

В представлених методичних вказівках пропонуються хімічні методи виявлення та кількісного визначення окремих субстратів та продуктів бродіння, а також розглядаються більш продуктивні фізичні аналітичні методи.

1. ЗАГАЛЬНІ ВКАЗІВКИ ДО ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ

1.1. ОСНОВНІ ПРАВИЛА РОБОТИ ТА ВИМОГИ З ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ

ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

Кожен студент зобов'язаний:

- 1) бути атестованим зі знання норм, правил та інструкцій безпеки;
- 2) отримати у свого викладача інструктаж з обов'язковим записом у журналі інструктажу з техніки безпеки (далі – ТБ);
- 3) не порушувати правила ТБ і внутрішнього розпорядку;
- 4) не чіпати і не включати без дозволу викладача чи старшого лаборанта електроприлади;
- 5) виконувати тільки доручену йому роботу;
- 6) не залишати свою роботу без нагляду з метою уникнення небезпечних ситуацій;
- 7) обережно працювати з приладами та скляним посудом.

Студенту заборонено:

- 8) працювати одному в лабораторії;
- 9) знаходитися у лабораторії у верхньому одязі;
- 10) пробувати хімічні речовини на смак;
- 11) виливати у раковини залишки реактивів, вогнетривких і отруйних речовин; вказані речовини необхідно зливати у спеціальні посудини.

ВИМОГИ ТБ ПЕРЕД ПОЧАТКОМ РОБІТ

- 1) в лабораторії одягати робочий одяг (халат і шапочка);
- 2) оглядати робоче місце і прибрати предмети, які не стосуються роботи;
- 3) оцінити освітленість робочого місця (чи сліпить очі і чи його достатньо);
- 4) переконатися у справності обладнання, необхідного для виконання роботи;
- 5) перед початком роботи ознайомитися із завданням, матеріалами та приладами.

ВИМОГИ ТБ ПІД ЧАС ВИКОНАННЯ РОБІТ

- 1) всі роботи з кислотами та лугами проводити у захисних окулярах та гумових рукавичках;
- 2) розводити сульфатну кислоту тільки у термостійкій посудині **(Увага! доливати кислоту до води, а не навпаки);**
- 3) розчиняти гідроксиди натрію і калію треба дуже повільно шляхом додавання їх до води невеликими порціями. Тверді луги брати тільки кусачками, а не руками;
- 4) всі роботи з відбору нітратної, сульфатної та хлоридної кислот виконувати під витяжною шафою у захисних окулярах.

ВИМОГИ ТБ ПІСЛЯ ЗАВЕРШЕННЯ РОБІТ

- 1) впорядкувати своє робоче місце;
- 2) після виконання роботи повідомити викладача чи старшого лаборанта про завершення дорученої роботи;
- 3) перед відходом із лабораторії вимкнути електричні прилади, вимкнути газові пальники і помити посуд.

У випадку пожежі переконатися у власній безпеці, терміново викликати пожежну частину за телефоном 101 та приступити до її гасіння наявними засобами пожежогасіння.

У всіх випадках виконувати вказівки керівника робіт для ліквідації наслідків аварії.

1.2. ЗАХОДИ З НАДАННЯ ПЕРШОЇ ДОМЕДИЧНОЇ ДОПОМОГИ ПРИ НЕЩАСНИХ ВИПАДКАХ

ПЕРША ДОПОМОГА ПРИ УРАЖЕННІ ЕЛЕКТРИЧНИМ СТРУМОМ

При ураженні електричним струмом необхідно якнайшвидше визволити потерпілого від дії електричного струму, виключивши електроприлад від джерела струму, а при неможливості відключення – відтягнути його від струмопровідних деталей за одягу, або застосувати підручний ізоляційний матеріал.

При відсутності у потерпілого дихання та пульсу необхідно зробити штучне дихання та непрямий масаж серця, звертаючи увагу на зіниці. Розширені зіниці свідчать про різке погіршення кровообігу мозку. У такому стані необхідно негайно починати оживлення і викликати швидку медичну допомогу.

ПЕРША ДОПОМОГА ПРИ ПОРАНЕННЯХ

При порізах битим скляним лабораторним посудом, рану очистити від уламків скла стерильним пінцетом або стерильною марлею. Накласти на рану стерильний перев'язувальний матеріал із індивідуального пакету і перев'язати його бинтом. За відсутності індивідуального пакету, можна перев'язати чистим матеріалом (носовою хусточкою, чистою полотняною ганчіркою і т.п.). При забруднених ранах можна на місце у пов'язці, яке припадатиме на рану накапати декілька крапель йоду, щоб отримати пляму розміром більшим, ніж рана.

ПЕРША ДОПОМОГА ПРИ ВИВИХАХ, ПЕРЕЛОМАХ, УДАРАХ

При переломах та вивихах кінцівок необхідно укріпити пошкоджене місце шиною, фанерною пластиною, палицею, картоном, або іншим подібним предметом. Пошкоджену руку можна також підвісити за допомогою перев'язки або хустки до шиї та прибинтувати до тіла.

При переломі черепа за неусвідомленого стану після удару по голові (спостерігається кровотеча з вух, рота) прикласти до голови холодний предмет (грілку з льодом, або снігом, чи холодною водою), або зробити холодну примочку.

При підозрі на перелом хребта необхідно потерпілого покласти на дошку не підіймаючи його і повернути на живіт обличчям вниз. З метою уникнення пошкодження спинного мозку, не дозволяти тілу перехилитись.

При переломі ребер (характеризується болем при диханні, чханні, кашлю та рухах) необхідно туго забинтувати грудну клітку, або стягнути її рушником під час видиху.

ПЕРША ДОПОМОГА ПРИ ОПІКАХ КИСЛОТАМИ АБО ЛУГАМИ

При потраплянні кислоти або лугу на шкіру необхідно:

- зменшити концентрацію діючого чинника шляхом змивання його водою впродовж 5-10 хвилин;
- нейтралізувати залишки чинника, а саме: поверхню пошкоджену кислотою промити 5% розчином соди, а поверхню пошкоджену лугом промити 5% розчином оцтової чи борної кислоти;
- змити продукти нейтралізації водою впродовж 5-10 хвилин.

При потраплянні кислоти або лугу на слизові оболонки очей необхідно:

- зменшити концентрацію діючого чинника шляхом змивання його водою впродовж 5-10 хвилин;
- нейтралізувати залишки чинника, а саме: при попаданні кислоти промити 2% розчином соди, а при попаданні лугу промити 2% розчином борної кислоти;
- змити продукти нейтралізації водою впродовж 5-10 хвилин.

При потраплянні кислоти або лугу на слизові оболонки ротової порожнини необхідно:

- зменшити концентрацію діючого чинника шляхом полоскання рота водою впродовж 5-10 хвилин;
- нейтралізувати залишки чинника, а саме: при попаданні кислоти промити 5% розчином соди, а при попаданні лугу промити 3% розчином оцтової або борної кислоти;
- прополокати рот водою.

ПЕРША ДОПОМОГА ПРИ ТЕПЛОВИХ ОПІКАХ

При опіку вогнем, парою чи гарячими предметами не можна розкривати утворені пухирі та перев'язувати їх бинтом.

При опіку першого ступеня (почервоніння) обпечене місце охолодити водою і накласти бинт на місце опіку. При опіку другого ступеня (пухирі) обпечене місце промити прохолодною водою, нанести тонким шаром протиопіковий гель зі знеболюючим ефектом і накласти бинт. При опіку третього ступеня (пошкодження шкірної тканини) рану накривають стерильною пов'язкою і викликають лікаря.

ПЕРША ДОПОМОГА ПРИ КРОВОТЕЧІ

Підняти поранену кінцівку вгору.

Рану закрити перев'язувальним матеріалом (із пакету) складеним у клубок, притиснути його зверху не торкаючись країв рани і протримати 4-5 хвилин. Якщо кровотеча зупинилася, тоді, не знімаючи перев'язувального матеріалу, поверх нього накласти ще одну подушечку із другого пакету, або шматок вати та, притискаючи, забинтувати поранене місце.

Якщо кровотечу неможливо зупинити пов'язкою, стискати кровоносні судини, котрі насичують поранену область шляхом згинання суглобів, а також пальцями, жгутом, турнікетом або затискачем. У разі сильної кровотечі необхідно викликати лікаря.

2. МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА МІКРООРГАНІЗМІВ – ЗБУДНИКІВ БРОДІННЯ

2.1. МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ДРІЖДЖІВ – ЗБУДНИКІВ БРОДІННЯ

ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Дріжджі в біотехнології використовуються у трьох напрямках, зокрема для:

- проведення спиртового бродіння (спиртові та хлібопекарські);
- одержання протеїнових добавок (кормові дріжджі);
- біосинтезу органічних речовин (жири, біологічно-активні речовини).

Вирощують дріжджі на джерелах вуглеводів, вуглеводнях нафти та харчових відходах. При виробництві дріжджів на меласі теоретично зі 100 г останньої можна отримати 210 г дріжджів (27% сухої речовини). Якість дріжджів залежить від якості вихідної культури дріжджів: 1) посів музейної культури на скошений агар при 30°C протягом 24 год; 2) посів однієї петлі чистої культури (чк) з агару на живильне середовище; 3) пересіви через 10 діб для одержання чк при 30°C протягом 16-18 год на живильне середовище (солодове сусло).

Кінцева суспензія дріжджового виробництва – дріжджова барда, з неї після сепарації та промивки одержують концентрат.

На однопродуктових дріжджових заводах товарні дріжджі ЛК-14, 1121В культивують при 28-30°C протягом 10-12 год. На спиртових заводах, де є двопродуктове виробництво, використовують У-563, У-1330. Кислотність дріжджів спиртових заводів на 11-16% нижча, ніж на спеціалізованих, що знижує накопичення кислот в готовій продукції. Швидкість бродіння цукрів дріжджами спиртових заводів є вищою.

Дріжджова клітина має складну будову. В ній розрізняють оболонку і вміст клітини – ядро і плазму з різними органοїдами. Хімічний склад дріжджевої клітини залежить від раси, поживного середовища та фізіологічного стану.

Встановлено, що метаболіти біохімічних перетворень при спиртовому бродінні характеризують процес бродіння та дозрівання пива. При зброджуванні глюкози дріжджами можуть утворюватися кислоти, які в подальшому використовуються для біосинтезу нейтральних продуктів, зокрема: ацетоїну, діацетилу, 2,3-бутиленгліколю.

Спиртове бродіння також здійснюють деякі види бактерій, зокрема: *Sarzina ventriculi*, *Zimomonas mobilis* і *Zimomonas anaerobia*.

Лабораторна робота

Завдання 1. Вивчення дріжджів – збудників бродіння

Хлібопекарські дріжджі одержують культивуванням швидкоростучих рас верхового бродіння *Saccharomices cerevisiae*. У фазі росту дріжджі існують переважно у вигляді окремих клітин круглої, овальної, серповидної форми. У клітині дріжджів чітко диференційовані оболонки, ядро, органели, запасні поживні речовини (глікоген), вакуолі, резервні речовини (ліпіди). У старих та незрілих клітин глікоген відсутній. Оцінюють технологічні властивості (функціональна активність та життєздатність) дріжджів за їх морфологією, яку вивчають під мікроскопом при середніх та великих збільшеннях з використанням забарвлених та незабарвлених препаратів.

Дослід 1. Вивчення морфології дріжджів в препараті «Роздавлена крапля»

Матеріали та обладнання:

- | | |
|---------------------------------|---------------------------|
| 1) хлібопекарські сухі дріжджі; | 6) фарфорова ступка; |
| 2) мікроскоп; | 7) фарфоровий пестик; |
| 3) мікробіологічна петля; | 8) мірна колба на 100 мл; |
| 4) знежирене предметне скло; | 9) аналітична вага; |
| 5) покривне скло; | 10) піпетка на 1.0 мл. |

Хід роботи. Готують 0,1% суспензію із пресованих дріжджів, розтираючи 0,1 г дріжджів в ступці з 2 мл стерильної водопровідної води. Розтерту масу зливають в мірну колбу на 100 мл, доводять до мітки водою і збовтують до одержання рівномірної густини у різних по висоті широтах. Краплю суспензії наносять на предметне скельце. Вона повинна бути невеликою, щоб рідина не виступала за межі покривного скельця, яке накладають на краплю так, щоб не було пухирців повітря. Незабарвлений препарат «роздавлена крапля» розглядають під мікроскопом (об'єктив 40х15). Визначають величину та форму клітин і наявність у них вакуолей. Дріжджі розміром до 10-15 мкм вимірюють під мікроскопом мікрометром (окулярною лінійкою), вимірявши не менше 20 клітин і вказують середні розміри. Результати записують та замальовують.

Дослід 2. Підрахунок кількості дріжджових клітин в 1.0 г пресованих дріжджів

Матеріали та обладнання:

- 1) 0,1% суспензія із пресованих дріжджів від попереднього досліду;
- 2) камера Горяєва-Тома;
- 3) мікроскоп;
- 4) піпетка на 1.0 мл.

Хід роботи. 0,1% суспензію із пресованих дріжджів від попереднього досліду піпеткою наносять на сітку камери Горяєва, яку встановлюють на предметний столик мікроскопа. Підрахунок клітин проводять через 3-5 хвилин з моменту приготування препарату (клітини повинні осісти і перебувати в одній площині) використовуючи об'єктив 8. Підраховують кількість клітин в 10 великих квадратах сітки, переміщаючи її по діагоналі; враховують всі клітини, що лежать в квадратику сітки, а також ті, що перетинають верхню і праву сторону квадрата. Після закінчення роботи камеру промивають дистильованою водою та протирають серветкою.

Підрахунки: Спочатку вираховують середню кількість клітин над великим квадратом; виходячи з того, що об'єм рідини над великим квадратом становить 0.004 мікролітра вираховують кількість клітин (N) в 1мл суспензії за формулою:

$$N = a/4 \times 10^6,$$

де а – середня кількість клітин над великим квадратом сітки.

Кількість дріжджових клітин в 1 г пресованих дріжджів розраховують за формулою: $X = N \times V/v$, де: N кількість клітин в 1мл суспензії; V – об'єм мірної колби, мл; v – наважка пресованих дріжджів, г.

Дослід 3. Визначення глікогену в препараті «Роздавлена крапля»

Матеріали, обладнання та реактиви:

- 1) дріжджі хлібопекарські пресовані та сухі);
- 2) мікробіологічна петля;
- 3) предметне скло;
- 4) суміш гліцерину і етанолу(1:1);
- 5) розчин Люголя.

Хід роботи. Готують 0,1% суспензію із пресованих та сухих дріжджів (Див. приготування у досліді 1). На предметне скло наносять краплю суміші гліцерину із етанолом, потім в неї мікробіологічною петлею вносять краплю суспензії пресованих дріжджів і краплю розчину Люголя, готують препарат «роздавлена крапля» і розглядають під мікроскопом (об'єктив 40х15). Аналогічно готують препарат із суспензії сухих дріжджів. Спостерігають зміну забарвлення. (Глікоген забарвлюється в червоно-бурий колір).

Дослід 4. Визначення підйомної сили та осмочутливості дріжджів

Підйомна сила характеризує ензиматичну активність дріжджів в тісті, а осмочутливість – зміну активності в розчинах кухонної солі. Підйомна сила дріжджів, визначена за стандартною методикою, має бути не більше ніж 75 хв. В основу методу визначення підйомної сили дріжджів покладено властивість кульки тіста спливати на поверхню води внаслідок утворення оксиду карбону ($1V$) під час зброджування цукрів борошна.

Осмочутливість знаходять за рівнянням часу спливання кульки тіста у воді і сольовому розчині.

Матеріали, обладнання та реактиви:

- 1) термостат;
- 2) аналітична вага;
- 3) борошно пшеничне другого гатунку
- 4) 3,85%-й розчин NaCl;
- 5) фарфорова чашка – 2 шт;
- 6) склянки місткістю 200 – 250мл – 2шт;
- 7) дріжджі хлібопекарські пресовані;
- 8) піпетка на 5.0 мл;
- 9) скляні палички – 2 шт.

Хід роботи Зважують дві наважки дріжджів масами 0,31 г з точністю до 0,01 г. і висипають у фарфорові чашки. До однієї наважки доливають 4,8 мл водопровідної води, яка нагріта до температури 35 °С, ретельно перемішують, додають пшеничне борошно другого гатунку масою 6,5...7,5 г /залежно від вологості/, швидко замішують тісто, надаючи йому форму кульки. Кульку опускають у склянку з водою (35 °С), яку ставлять у термостат для підтримання температури 35 °С. Засікають час від опускання до підйому кульки на поверхню води /спливання/.

До другої наважки дріжджів доливають з 4,8 мл 3,85%-го розчину NaCl, підігрітого до температури 35°C далі аналіз виконують, як і з першою наважкою. Проміжок часу в хвилинах між опусканням і спливанням кульки тіста, помножений на емпіричний коефіцієнт вказує на величину підйомної сили за стандартним методом.

**Емпіричний коефіцієнт
для визначення величини підйомної сили дріжджів**

Час спливання кульки, хв	9	10	11	12	13	14	15
Коефіцієнт перерахунку	4.50	4.20	4.00	3.90	3.80	3.75	3.70

Різниця між величинами підйомної сили, визначеної в тісті з кухонною сіллю та без неї, характеризує осмочутливість дріжджів. Чим різниця менша, тим вище осмочутливість дріжджів.

Дослід 5. Визначення кислотності дріжджів

Кислотність дріжджів визначають методом нейтралізації використовуючи в якості індикатора спиртовий розчин фенолфталеїну. В зв'язку з тим, що в дріжджах основною кислотою є оцтова, кислотність виражають в міліграмах оцтової кислоти в 100 г дріжджів.

Матеріали, обладнання та реактиви:

- 1) аналітична вага;
- 2) фарфорова ступка;
- 3) бюретка на 25 мл;
- 4) 0,1 N NaOH;
- 5) 1.0%-й спиртовий розчин фенолфталеїну;
- 6) дріжджі хлібопекарські пресовані;
- 7) магнітна мішалка.

Хід роботи. Зважують 10,0 г дріжджів і переносять у фарфорову ступку, розтирають скляною паличкою з 50 мл дистильованої води. Одержану суспензію титрують з бюретки 0,1 н. розчином гідроксиду натрію, додаючи 3-4 краплі фенолфталеїну до появи рожевого забарвлення.

Кислотність (К) дріжджів розраховують за формулою

$$K = a \times 6 \times 100 / 10 = 60 \times a \text{ мг оцтової кислоти на 100 г дріжджів,}$$

де: а – витрати 0,1 N NaOH на титрування, мл;

6 – кількість міліграмів оцтової кислоти, що відповідає 1 мл 0,1 н. NaOH;

100 – перевірений коефіцієнт на 100 г дріжджів;

10 – маса наважки.

Дослід 6. Плазмоліз дріжджових клітин.

Матеріали, обладнання та реактиви:

- 1) мікроскоп;
- 2) предметне скло;
- 3) 0.1% суспензія із пресованих дріжджів;
- 4) NaCl (декілька кристаликів).

Хід роботи. Краплю 0.1% суспензії пресованих дріжджів поміщають на предметне скло та вносять в неї декілька кристаликів NaCl. Через 5 хв проводять мікроскопування (збільшення 40х15). Спостерігають зміну форми клітин

Примітка. В плазмолізованих клітинах протоплазма відділяється від оболонки.

2.2. МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРІЙ – ЗБУДНИКІВ БРОДІННЯ

ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Бактерії здійснюють такі типи бродіння, як: молочнокисле, маслянокисле і ацетонбутанолове, пропіоновокисле і бурштиновокисле, змішане і бутандіолове, метанове і сульфатредукцію та бродіння нітрогеновмісних сполук. Найбільше продукції виробляється з використанням збудників молочнокислого і маслянокислого бродіння.

Молочнокисле бродіння – процес перетворення цукру молочнокислими бактеріями до молочної кислоти. Збудники цього процесу – молочнокислі бактерії – дуже поширені в природі (повітрі, воді, ґрунті, на овочах, фруктах, у молоці, кишечнику людини і тварин тощо). Молочнокислі бактерії володіють високою бродильною здатністю і відрізняються відсутністю більшості біосинтетичних шляхів. Це обумовлює високу вимогливість розглянутих бактерій до джерел живлення, яка задовольняється лише на таких середовищах, як тканини рослин, молоко, вміст шлунково-кишкового тракту людини та тварин. Джерелом енергії для цих бактерій служать головним чином моно- і дисахариди. Молочнокислі бактерії мають кулясту або паличкоподібну форму, не утворюють спор, нерухливі, грампозитивні.

Молочнокисле бродіння залежно від продуктів, що виділяються крім молочної кислоти та їх відсоткового співвідношення поділяється на

дві групи: гомоензиматичне $C_6H_{12}O_6 = 2CH_3CHONCOOH$ (молочна кислота становить не менше 90%) і гетероензиматичне молочнокисле бродіння:



Відмінність також полягає і в різних шляхах отримання пірувату при деградації вуглеводів. Так, при гетероензиматичному бродінні деградація глюкози йде по пентозофосфатному шляху. Гліцеральдегід-3-фосфат утворюється з ксилулозо-5-фосфату та окиснюється до молочної кислоти, а ацетилфосфат відновлюється до етанолу або ацетату). Таким чином, при гетероензиматичному молочнокислому бродінні утворюється більше продуктів, зокрема: молочна кислота, оцтова кислота, етанол та CO_2 .

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

Крім речовин, що містять Карбон і Нітроген, молочнокислим бактеріям необхідні фосфор, калій, кальцій та інші елементи, які зазвичай надходять в середовище з різними мінеральними сполуками. Більшість молочнокислих бактерій потребує ростових речовин. Окремим бактеріям для розвитку потрібен рибофлавін.

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

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

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

Бактерії роду *Streptococcus* мають круглі або злегка овальні клітини діаметром 0,5-1 мкм, розташовані поодинокі, парами або в ланцюжках.

Вони поширені у природі на рослинах, у ґрунті, гної, у молоці та інших субстратах. Бактерії роду *Streptococcus* використовуються у ряді харчових виробництв. До даного роду відносять види *S. lactis*, *S. lactis* var. *Diacetilactis*, *S. cremoris*, *S. thermophilus*.

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

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

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

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

Перша група представлена організмами, які, як правило, ростуть при 45°C і вище, зазвичай не розвиваються при 20°C і ніколи не ростуть при 15°C. Це *L. Delbrueckii*, *L. Leichmannii*, *L. Lactis*, *L. Bulgaricus*, *L. Helveticus* і *L. Acidophilus*.

Представники другої групи при розвитку в молоці утворюють короткі ланцюжки. Це група менш активних молочнокислих паличок. Вони добре розвиваються при 15-38°C, оптимум для них становить 30°C. У молоці, молочних продуктах і на рослинах зазвичай виявляють кілька видів бактерій другої групи: *L. Casei*, *L. Xylosus*, *L. Plantarum*, *L. Curvatus*. *L. Casei* відіграє важливу роль у дозріванні сирів. *L. Plantarum* бере участь у молочнокислому бродінні при квашенні овочів і силосуванні.

Гетероензиматичне молочнокисле бродіння здійснюють представники родів *Leuconostoc*, *Lactobacillus* (нідпід *Betabacterium*), *Bifidobacterium*.

Бактерії роду *Leuconostoc* мають вигляд сферичних або частіше сочевицеподібних клітин. Клітини розташовуються поодинокі, парами

або в коротких ланцюжках, купкоподібних скупчень не виявлено. Грампозитивні. Спор не утворюють. Факультативні анаероби, оптимум температури для них становить 20-30°C. На середовищах з сахарозою в цих організмів з'являється товста зовнішня оболонка з слизу або декстранів.

Види роду виявляються головним чином на рослинних матеріалах (іноді в молоці). *L. Mesenteroides* і *L. Dextransum* беруть активну участь у зброджуванні вуглеводів при квашенні капусти і силосуванні. *L. Dextransum* і *L. Cremoris* зброджують цитринову кислоту з утворенням діацетилу, тому вони можуть бути компонентами заквасок, застосовуваних у масло- і сироварінні

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

Бактерії, що відносяться до роду *Bifidobacterium* є нерухомі, прямі або розгалужені палички; бувають клітини роздвоєної (V), булавовидної або лопатоподібної форми, не утворюють спор, грампозитивні. Строгі анаероби, не переносять присутності O₂. Оптимум температури для них становить 36-38°C. Клітини розташовуються поодинокі, парами, іноді ланцюжками або розетками, розмір клітин від 0,5 до 1,3-1,5-8 мкм. Мікроскопічна картина кожного виду біфідобактерій має особливості за розміром, формою і розташуванням клітин.

Відомо більше 20 видів біфідобактерій; типовий представник роду *B. bifidum*. Біфідобактерії – мешканці кишечника людини, тварин, комах і т.п. Встановлено, що представники роду *Bifidobacterium* складають від 50 до 90 % мікробного вмісту фекалій людини.

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

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

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

Lactobacillus plantarum і *L. Coryneformis* використовують в хлібопеченні.

Деякі лактобацили і стрептококи застосовуються при виготовленні сирокочених ковбас. Вони знижують рН середовища за рахунок утворення лактату, тим самим оберігаючи від псування ковбаси, які за технологією не піддаються варінню (саямі, сервелат та ін.).

Молочнокисле бродіння, що здійснюється *L. Delbrueckii*, лежить в основі отримання молочної кислоти.

Для отримання декстранів використовують штами *Leuconoctoc mesenteroides*

Молочнокисле бродіння є основою таких важливих виробництв, як переробка молока на кисломолочні продукти, сири і масло, випікання кислого чорного хліба, квашення овочів, силосування кормів, тощо.

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

Клостридії облігатні анаероби. Однак спектр чутливості клостридій до кисню достатньо широкий, що пов'язано з функціонуванням ензиму супероксиддисмутази або іншими механізмами, що допомагають клітинам нейтралізувати токсичні ефекти O_2 і його похідних. Джерелом енергії для клостридій в більшості випадків є маслянокисле бродіння.

Більшість бактерій роду клостридій сапрофіти, що мешкають у ґрунті. Деякі види клостридій живуть в кишечнику людини і тварин. В біотехнологічних виробництвах в якості продуцентів масляної кислоти використовують штами *C. Butyricum*, а в якості продуцентів нейтральних продуктів *C. acetobutylicum*.

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

Маслянокисле бродіння починається з трансформації цукрів у піруват шляхом Ембдена-Мейєргофа-Парнаса. Кінцеві продукти з пірувату утворюються в ланцюзі послідовних реакцій, які каталізують декілька ензимних систем. Нове у маслянокислому бродінні – виникнення реакцій конденсації типу $C2 + C2 = C4$, в результаті чого утворюється С4-акцепторна кислота – ацетоацетил-КоА, що відновлюється НАДН₂. Кінцевим С4-продуктом бродіння є масляна кислота.

Лабораторна робота

Завдання 2. Вивчення бактерій – збудників бродіння

Дослід 1. Отримання молочнокислих бактерій та вивчення їх морфології

Матеріали, обладнання та реактиви:

- | | |
|---|-----------------------|
| 1) свіже молоко – 200 мл; | 5) газовий пальник; |
| 2) термостат; | 6) мікроскоп; |
| 3) предметні скла; | 7) метиленовий синій. |
| 4) стерильні пробірки на 40.0 мл – 4 шт.; | |

Хід роботи. Молочнокислі бактерії отримують методом збагачення. Для цього свіже молоко наливають у стерильні пробірки (30-35 мл) і для розвитку бактерій ставлять на 48 годин у термостат для підтримання $t=30^{\circ}\text{C}$. Спостерігають у якій із пробірок найшвидше утворився щільний згусток і відбирають її для подальших досліджень. Із сироватки зсілого молока готують мазок, який сушать і фіксують над полум'ям пальника. На гарячий мазок кладуть фільтрувальний папір, щоб зняти жир. Зразок фарбують метиленовим синім (барвник добре забарвлює мікроорганізми і слабо – казеїн молока), мікроскопують і замальовують у протоколі.

Мікробіологічна картина буде складатися переважно з однорідної культури довгих паличкоподібних бактерій *Lactobacillus bulgaricus* і *Lactobacillus acidophilus* та молочних стрептококів - *Streptococcus lactis*,

Дослід 3. Отримання маслянокислих бактерій та вивчення їх морфології

Матеріали, обладнання та реактиви:

- | | |
|-----------------------------|-------------------------------------|
| 1) сира неочищена картопля; | 7) широка і висока пробірка - 4 шт; |
| 2) крейда (0.5 г); | 8) кипляча водяна баня; |
| 3) термостат; | 9) розчин Люголя; |
| 4) предметні скла; | 10) покривні скла; |
| 5) вага; | 11) імерсійна олія. |
| 6) мікроскоп; | |

Хід роботи. Сиру неочищену картоплю нарізати дрібними шматочками і заповнити нею 1/3 об'єму пробірки, потім залити водопровідною до 2/3 загального об'єму. Зважити 0.5 г крейди і додати до пробірки,. Пробірку ставлять у киплячу водяну баню на 2 хвилини. Потім охолоджують під проточною водою. Охолоджену пробірку поміщають у термостат з температурою 35-37°C. Маслянокисле бродіння триватиме 1-2 доби. Із збродженої рідини взятої із дна пробірки готують препарат живих клітин. У препарат додають 1-2 краплі розчину Люголя, накривають покривним склом, досліджують мікроскопічну картину у імерсійній системі. Ті місця клітини, де міститься гранульоза, забарвлюються у синій колір. При спороутворенні форма клітин змінюється; утворюються кластридальні, а іноді плектридальні форми.

Мікроскопічну картину замальовують у протоколі.

3. АНАЛІЗ СУБСТРАТІВ ТА ПРОДУКТІВ РЕАКЦІЙ РІЗНИХ ТИПІВ БРОДІННЯ

Субстрати та основні продукти реакцій різних типів бродіння представлено у таблиці 1.

**Таблиця 1. Субстрати та основні продукти реакцій
основних типів бродіння**

Тип бродіння		Субстрати бродіння	Основні продукти бродіння
спиртове здійснюване дріжджами і бактеріями		глюкоза	етанол, CO ₂
молочнокисле	гомоензиматичне	глюкоза	лактат
		фруктоза	лактат, ацетат,
		цитрат	ацетоїн
	гетероензиматичне	глюкоза	лактат, етанол, + CO ₂
	здійснюване біфідобактеріями	глюкоза	лактат, ацетат (2:3)
маслянокисле і ацетон-бутанолове		глюкоза	бутират, CO ₂ , H ₂
			бутанол, ацетон, H ₂ , CO ₂
змішане і бутандіолове		глюкоза	2,3-бутандіол, ацетат, лактат, бурштинат, форміат (H ₂ + CO ₂)
пропіоновокисле і бурштиновокисле		глюкоза, лактат	пропіонат, ацетат, CO ₂
яблучно-молочнокисле		яблучна	лактат

Дані таблиці 1 свідчать про те, що **глюкоза** є домінуючим субстратом для реакцій різних типів бродіння. Її джерелом є, в основному, крохмаль, вміст якого в рослинній сировині для найбільш тонажного – спиртового бродіння становить від 55% до 70% на суху масу.

3.1. Виявлення і визначення рівня полісахаридів і олігосахаридів та продуктів їх розщеплення в сировині та бродильних середовищах.

ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Крохмаль. Термін «крохмаль» зазвичай використовують для позначення полісахариду, який зафарбовується йодом і зустрічається у рослинах у вигляді чітко виражених гранул, що нерозчинні у воді. Він завжди містить **амілопектин**, який побудований із ланцюгів, які містять 20-25 залишків глюкози. Ці залишки з'єднані між собою α -1,4-зв'язками, а також окремими нерівномірно розподіленими α -1,6-зв'язками.

Другим компонентом крохмалю є **амілоза**, молекула якої побудована в основному лінійно і складаються із довгих ланцюгів, що містять 200-2100 залишків глюкози з'єднаних один з одним α -1,4-зв'язками.

ПРИНЦИПИ ВИЗНАЧЕННЯ КРОХМАЛЮ

Використовувані методи визначення крохмалю можна розділити на п'ять груп, зокрема:

- 1) гравітаметричні;
- 2) шляхом вимірювання інтенсивності зафарбування йодом;
- 3) шляхом вимірювання редукуючої здатності після ензимного розщеплення;
- 4) шляхом вимірювання оптичної активності;
- 5) шляхом вимірювання редукуючої здатності після кислотного гідролізу.

Методи першого типу. Матеріал екстрагують кислотою для розчинення крохмалю. Потім його осаджують спиртом і зважують.

Методи другого і третього типу ґрунтуються на специфічних властивостях крохмалю, але отримувані результати залежать від співвідношення амілопектину і амілози. Річ в тім, що амілопектин і амілоза різняться за ступенем зафарбування йодом та розщеплюваністю ензимами.

Метод четвертого типу ґрунтується на визначенні питомого повертання крохмалю. Вважається найбільш специфічним, бо результати не залежать від вмісту амілози і амілопектину, оскільки вони мають однакове питоме повертання.

Методи п'ятого типу полягають в кислотному гідролізі крохмалю з наступним вимірюванням редукуючої здатності вивільненої глюкози.

Лабораторна робота

Дослід 1. Кольорові реакції на крохмаль.

Характерною реакцією на крохмаль є поява синього забарвлення від розчину Люголя йоду в йодиді калію. Реакція ґрунтується на утворенні нестійкої адсорбційної сполуки крохмалю з йодом. Оскільки утворена сполука нестійка, а розчин володіє колоїдними властивостями, тому реакція крохмалю з йодом чутлива до наявності етанолу, нагрівання і лугів з якими йод утворює гіпойодити.

Матеріали, обладнання та реактиви:

- | | |
|---------------------------|--------------------------|
| 1) штатив для пробірок; | 5) піпетка на 10.0 мл; |
| 2) пробірки – 3 шт; | 6) етанол; |
| 3) 3). піпетка на 1.0 мл; | 7) 1.0% розчин крохмалю; |
| 4) 4) розчин Люголя; | 8) 10.0% NaOH. |

Хід роботи. У пробірку наливають 6-7 мл 1.0% розчину крохмалю, додають одну краплю розчину Люголя (у 100 мл води розчинити 20.0 г КJ і 10.0 г J) рідина зафарбовується у синій колір. Зафарбований розчин розділити у три пробірки. До першої пробірки додати декілька крапель 10.0% NaOH, до другої пробірки додати етанолу, а третю пробірку нагріти до кипіння. У всіх варіантах зафарбування зникає, але у третій пробірці воно появляється при охолодженні. Отже, пробу з розчином Люголя необхідно проводити тільки з холодним розчином крохмалю.

Дослід 2. Гідроліз крохмалю кислотою

ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Крохмаль не дає реакцій відновлення, але при нагріванні з концентрованою мінеральною кислотою він розщеплюється на декстрини різної складності, а на кінець дає глюкозу. Розрізняють чотири групи декстринів.

Амілодекстрини. За будовою вони найближчі до крохмалю, осаджуються етанолом, з розчином Люголя дають синє зафарбування. Відновлювальна здатність (з реактивом Фелінга) становить 1.0% відновлювальної здатності мальтози.

Еритродекстрини. З розчином Люголя дають червоне зафарбування, осаджуються етанолом. Відновлювальна здатність становить 2.0-3.0% відновлювальної здатності мальтози.

Ахродекстрини. Розчином Люголя не фарбуються, розчиняються у 70.0% етанолі. Відновлювальна здатність становить 10.0% відновлювальної здатності мальтози.

Мальтодекстрини. Розчином Люголя не фарбуються, етанолом не осаджуються. Відновлювальна здатність становить 40.0% відновлювальної здатності мальтози.

Кінцевими продуктами гідролізу крохмалю є мальтоза і D-глюкоза; при проведенні ензиматичного гідролізу крохмаль розщеплюється тільки до мальтози.

Матеріали, обладнання та реактиви:

- | | |
|-------------------------------|----------------------------------|
| 1) штатив для пробірок; | 7) конічна колбочка на 100.0 мл; |
| 2) піпетки на 1.0 мл – 2 шт.; | 8) пробірки – 10 шт.; |
| 3) 20.0% H_2SO_4 ; | 9) 10.0% NaOH; |
| 4) розчин Люголя; | 10) лакмусовий папірець; |
| 5) реактив Фелінга; | 11) водяна баня. |
| 6) 1.0% розчин крохмалю; | |

Хід роботи. Взяти 10 пробірок і налити в них по 6-7 мл холодної води і додати 1-2 краплі розчину Люголя. В конічну колбочку налити 20.0 мл 1.0% розчину крохмалю, додати 0.5 мл 20.0% H_2SO_4 , перемішати і відібрати 0.5 мл суміші. Поставити колбочку із 1.0% розчином крохмалю у водяну баню; через 2-3 хв від початку кипіння досліду, а потім через кожних 2-3 хвилини відбирати . інкубовану суміш. Відбуватиметься поступова зміна кольору від синього до червоного, а потім зафарбування зникне.

Залишок прогідролізованого розчину крохмалю нейтралізують (по лакмусу), доливають реактив Фелінга і нагрівають. Випадає жовтий осад $CuOH$ або червоний – Cu_2O .

Дисахариди. Сировина, яка використовується у спиртовому бродінні крім крохмалю містить дисахариди переважно сахарозу, зокрема: у зерні злаків її рівень становить 2.0-4.7%; тільки у мелясі вміст сахарози становить 45-50% на суху речовину.

За хімічною природою дисахариди – це сполуки, які складаються із двох залишків моносахаридів сполучених між собою глікозидним зв'язком. Вони бувають *відновлюючими і невідновлюючими*.

У відновлюючих дисахаридах для виникнення оксигенового містка використовується глікозидний гідроксил лише одного моносахариду, а глікозидна група другого моносахариду, що залишилася, здатна до циклоланцюгової таутомерії з одержанням альдегідної групи. Дисахариди

такого типу відновлюють деякі метали із їх оксидів (тому їх називають відновлюючими). До них належать мальтоза–солодовий цукор (глюкоза+глюкоза), лактоза –молочний цукор (глюкоза + галактоза) тощо.

У невідновлюючих дисахаридів оксигеновий місток між молекулами моносахаридів утворений за участю двох глікозидних ОН-груп. Вони не відновлюють оксидів металів, не здатні до мутаротації та існують тільки у циклічній формі. До них належать сахароза-тростиний цукор (глюкоза+ фруктоза).

Дослід 3. Визначення глюкози за Фелінгом

ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

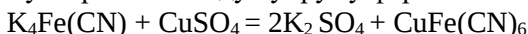
Більшість методів кількісного визначення глюкози ґрунтуються на реакціях окиснення за альдегідною групою з одночасним відновленням Cu^{2+} до Cu^{1+} . Тому цими реакціями можуть визначатися також інші редукуючі моно- і дисахариди. В реакції Фелінга відбувається складне окиснювальне розщеплення молекули цукру з утворенням декількох продуктів окиснення, зокрема: молочної, тартронової, глюконової та глюкуронової кислот. Для визначення готують два розчини:

I. 69.28 г $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ в 1000 мл води;

II. 346 г сегнетової солі ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{NaK} \times 4\text{H}_2\text{O}$) і 140.0 г NaOH у 1000 мл води.

Перед самим вживанням готують розчин Фелінга шляхом змішування рівних об'ємів розчину I і розчину II. 1.0 мл такого розчину відповідає 0.005 г глюкози. Реактив Фелінга використовується також у методі Бертрана.

Хід роботи. В конічну колбу налити 20.0 мл розчину Фелінга і додати 80.0 мл води, і нагрівати на сітці до кипіння і поступово із бюретки доливати (приблизно) 0.25% розчин глюкози. Під час доливання глюкози підтримувати кипіння Розчин глюкози доливати до повного зникнення голубого зафарбування. Оскільки, зникнення голубого забарвлення є непомітним, тому здійснюють індикаторну пробу. Для цієї проби краплю реакційної рідини капнути на молочно-біле скло підкислити оцтовою кислотою і додати краплю 10.0% калій-феро-111-гексаціаніду. В присутності солі оксиду Купрум(II) утворюється коричнева пляма внаслідок утворення оксиду купруму феро-111-гексаціаніду.



Якщо для знебарвлення 20.0 мл розчину Фелінга використано 40.0 мл досліджуваного розчину глюкози, то в 100.0 мл розчину глюкози міститься:

$$0.005 \times 20 \times 100 // = 0.25 \text{ г.}$$

Дослід 4. Кількісне визначення лактози у молоці йодометричним методом

Метод ґрунтується на окисненні альдегідної групи лактози йодом у лужному середовищі. Виділений при цьому Оксиген окиснює галактозу в лактобіонову кислоту, а глюкозу в глюконову кислоту. При визначенні цукрів за різницею між кількістю взятого (надміру) та непрореагованого йоду титруванням розчину тіосульфату натрію знаходять вміст цукру.

Матеріали, обладнання та реактиви:

- 1) вага; 9) рідина Фелінга;
- 2) мірна колба на 500 мл; 10 1н NaOH;
- 3) конічна колба на 300 мл – 3 шт.; 11) 0.1н J;
- 4) піпетка на 10 мл -2 шт.; 12) 0.1н NaOH;
- 5) піпетка на 1 мл; 13) 0.1н Na₂S₂O₃;
- 6) бюретка на 50 мл – 2 шт.; 14) 0.5н;
- 7) бюретка на 25 мл; 15) 0.5н HCl;
- 8) лійка; 16) 1% р-н крохмалю.

Хід роботи. Дослідження розпочинають з приготування фільтрату. Відважують з точністю до 0,01 г 25 молока (або відміряють 25 мл молока піпеткою і множать на густину молока) у мірну колбу місткістю 500 мл і доливають до половини колби дистильовану воду і 10 мл рідини Фелінга 1 (69.28 г CuSO₄ × 10H₂O в 1000 мл води), 4 мл 1н NaOH. Після всіх додавань суміш обережно перемішують, доводять до мітки водою (при температурі 20°C), знову перемішують, перевертають колбу 3-5 разів, і залишають на 30 хв.

Відстояну рідину фільтрують у суху чисту колбу через складчастий паперовий фільтр, видаляючи перші 20-30 мл фільтрату. У конічну колбу місткістю 250-300 мл з притертою або гумовою пробкою переносять 50 мл фільтрату (що відповідає 2,5 г молока). Піпеткою або з бюретки приливають 25 мл 0,1 н J і повільно, безперервно перемішуючи доливають з бюретки 37,5 мл 0,1н NaOH. Колбу закривають пробкою, залишають її в темному місці на 20 хв при температурі 20 °С. Потім піпеткою відміряють 8 мл 0,5 н **HCl** і титрують виділений йод 0,1 н Na₂S₂O₃

спочатку без додавання індикатора до отримання світло-жовтого забарвлення розчину, потім додають 1 мл 1%-го розчину крохмалю і продовжують титрування по краплях до моменту, коли від останньої краплі розчину тіосульфату натрію зникне синє забарвлення розчину.

Для холостого досліду в другу таку саму колбу і піпеткою відміряють 25 мл 0.1н J, 25 мл води і додають з бюретки 37,5 мл 0.1н NaOH, безперервно перемішуючи. Закривши колбу пробкою, залишають у темному місці на 20 хв при температурі 20°C. Далі визначення проводять так само, як з фільтратом.

Опрацювання результатів. Масова частка лактози у відсотках обчислюється за формулою: $L = (V_x - V_f) \times 0,699$, де V_x і V_f – об'єм 0,1 н $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, що йде на титрування йоду відповідно в холостому досліді і у фільтраті, мл.

Дослід 5. Рефрактометричне визначення лактози в молоці

Принцип методу. Визначення ґрунтується на вимірюванні показника переломлення прозорих розчинів лактози ($\text{C}_{12}\text{O}_{11}\text{H}_{22}$), отриманих при осадженні білків та жирів, що містяться в молоці, розчином хлориду кальцію.

Матеріали, обладнання та реактиви:

- | | |
|------------------|--|
| 1) молоко; | 5) рефрактометр типу УРЛ або РПЛ із термостатом; |
| 2) 8.0% ; | 6) піпетка на 1 мл; |
| 3) водяна баня; | 7) піпетка на 5 мл; |
| 4) скляний бюкс; | 8) краплинна піпетка. |

Хід роботи: У скляний бюкс піпеткою відбирають 5.0 мл свіжого молока і для осадження білків додають 0,50 мл 8.0% CaCl_2 . Бюкс закривають кришкою й нагрівають 10 хв на водяній бані при температурі кипіння, потім охолоджують під струменем водопровідної води приблизно до 20°C.

Перевіряють правильність роботи приладу по дистильованій воді. Краплинною піпеткою обережно відбирають декілька крапель прозорої рідини (сироватки) і швидко (щоб уникнути випару вологи) поміщають на нижню (вимірювальну) призму рефрактометра. Опускають верхню (освітлювальну) призму й вимірюють показник переломлення при $(18 \pm 0,2)^\circ\text{C}$, підтримуючи температуру за допомогою термостата.

Виконують 3-4 виміри показника переломлення молочної сироватки, розраховують середнє значення n.

По таблиці 2 знаходять масову частку лактози в аналізованому молоці (ω , %).

Істинний вміст лактози в молоці одержують при аналізі свіжого молока з кислотністю 16-20 °Т. При аналізі молока з підвищеною кислотністю результати завищені.

Таблиця 2. Масова доля лактози в молоці при 18 °С.

n_D^{18}	ω , %	n_D^{18}	ω , %	n_D^{18}	ω , %
1,3406	3,77	1,3415	4,23	1,3424	4,69
1,3408	3,87	1,3417	4,33	1,3426	4,79
1,3407	3,82	1,3416	4,28	1,3425	4,74
1,3408	3,87	1,3417	4,33	1,3426	4,79
1,3409	3,93	1,3418	4,38	1,3427	4,84
1,3410	3,98	1,3419	4,44	1,3428	4,89
1,3411	4,03	1,3420	4,49	1,3429	4,95
1,3412	4,08	1,3421	4,54	1,3430	5,00
1,3413	4,13	1,3422	4,59	1,3431	5,05
1,3414	4,18	1,3423	4,64	1,3432	5,10

Дослід 5. Визначення масової концентрації цукрів у суслі

ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Вміст цукрів характеризує тип вина та його смакові особливості. У винограді європейських сортів містяться глюкоза, фруктоза (у співвідношенні, близькому до 1) та сахароза (до 1,5%). При дозріванні та, особливо, перезріванні винограду співвідношення між глюкозою та фруктозою змінюється у бік переважання фруктози. У винограді американських сортів може бути до 10% сахарози. Цукор зосереджений, в основному, в соці ягоди, в процесі переробки винограду зазнають складних біохімічних перетворень і служать джерелом утворення нових сполук. Вміст цукрів у суслі становить 15.0-35.0%. Глюкоза і фруктоза є цукрами, що редукують, виявляють відновлювальну дію в мідно-лужному розчині. Для визначення масової концентрації цукрів у суслі широкого використання набули фізичні методи дослідження, зокрема: **ареометричний і рефрактометричний**

Для проведення визначень фізичними методами сусло необхідно освітлити. Найбільш застосовуваним методом освітлення є його відстоювання, яке є достатнім для використання сусла для бродіння. Однак, для проведення фізичних досліджень тільки відстоювання може бути недостатньо

5.1. Ареометричний метод

Принцип методу. Метод заснований на пропорційній залежності між густиною сусла та вмістом у ньому цукрів.

Матеріали та обладнання: освітлене сусло, ареометри, градуйовані від 1,000 до 1,080 і від 1,080 до 1,160, циліндр об'ємом 250 мл, термометр зі шкалою від 0 до 50°C з ціною поділки 0,2°C.

Хід роботи. 200 мл освітленого сусла наливають у циліндр, попередньо ополоснутий цим же суслом, і встановлюють його на строго горизонтальній площині. Вимірюють температуру сусла і опускають у нього ареометр, шкала якого підбирається таким чином, щоб нижня його частина після занурення знаходилася на відстані не менше 1 см від дна циліндра. Ареометр не повинен торкатися стінок циліндра. Відлік показань знімають по верхньому меніску для забарвленого сусла і по нижньому – для білого. Температура сусла повинна бути в межах $20 \pm 3^\circ\text{C}$. Якщо вона дорівнює 20°C , то густина сусла точно відповідатиме вмісту цукрів, вказаному в табл. 2; інакше необхідно до показань ареометра внести поправку, що становить 0,0002 за кожен градус. Якщо температура сусла нижче 20°C , поправку віднімають, якщо вище – додають. *Наприклад.* Густина сусла 1,085. Температура сусла – 17°C . Поправка становитиме $0,0002 \cdot 3 = 0,0006$, а остаточна густина $1,085 - 0,0006 = 1,0844$, але табл. 1 відповідає масовій концентрації 19,6 г цукрів на 100 мл сусла.

Таблиця 3. Залежність концентрації цукрів у суслі з його густини для ареометрів, градуйованих при 20°C , мл

Показ- ники ареометра	Концент- рація цукрів, г/дм ³	Показ- ники ареометра	Концент- рація цукрів, г/дм ³	Показ- ники ареометра	Концент- рація цукрів, г/дм ³
1,034	63,0	1,069	156,0	1,104	250,0
1,035	66,0	1,070	159,0	1,105	252,0
1,036	69,0	1,071	162,0	1,106	255,0

Показ- ники ареометра	Концент- рація цукрів, г/дмЗ	Показ- ники ареометра	Концент- рація цукрів, г/дмЗ	Показ- ники ареометра	Концент- рація цукрів, г/дмЗ
1,037	72,0	1,072	164,0	1,107	258,0
1,038	74,0	1,073	167,0	1,108	260,0
1,039	76,0	1,074	170,0	1,109	263,0
1,040	80,0	1,075	172,0	1,110	266,0
1,041	82,0	1,076	175,0	1,111	269,0
1,042	84,0	1,077	178,0	1,112	271,0
1,043	87,0	1,078	180,0	1,113	274,0
1,044	90,0	1,079	183,0	1,114	276,0
1,045	92,0	1,080	186,0	1,115	279,0
1,046	95,0	1,081	188,0	1,116	282,0
1,047	98,0	1,082	191,0	1,117	284,0
1,048	100,0	1,083	194,0	1,118	288,0
1,049	103,0	1,084	196,0	1,119	290,0
1,050	106,0	1,085	199,0	1,120	293,0
1,051	108,0	1,086	202,0	1,121	296,0
1,052	111,0	1,087	204,0	1,122	298,0
1,053	114,0	1,088	207,0	1,123	301,0
1,054	116,0	1,089	210,0	1,124	303,0
1,055	119,0	1,090	212,0	1,125	306,0
1,056	122,0	1,091	215,0	1,126	309,0
1,057	124,0	1,092	218,0	1,127	311,0
1,058	127,0	1,093	220,0	1,128	314,0
1,059	130,0	1,094	223,0	1,129	316,0
1,060	132,0	1,095	226,0	1,130	319,0
1,061	135,0	1,096	228,0	1,131	323,0
1,062	138,0	1,097	231,0	1,132	325,0
1,063	140,0	1,098	234,0	1,133	327,0
1,064	143,0	1,099	236,0	1,134	330,0
1,065	146,0	1,100	239,0	1,135	333,0
1,066	148,0	1,101	242,0	1,136	335,0
1,067	151,0	1,102	244,0	1,137	338,0
1,068	154,0	1,103	247,0	1,138	340,0

5.2. Рефрактометричний метод

Принцип методу. Метод ґрунтується на пропорційній залежності між показником заломлення сусла та вмістом у ньому сухих речовин.

Матеріали та обладнання: Освітлене сусло, лабораторний рефрактометр зі шкалою, градуйованою в масових відсотках сухих речовин з цукрози, клас точності 0,2, або автоматичний рефрактометр класу точності 0,5.

Хід роботи. Перед вимірюванням, пропускаючи через пристрій воду, встановлюють температуру в камерах призм рефрактометра, рівну 20°C. Потім перевіряють нульову точку приладу по дистильованій воді. Для цього піднімають верхню призму і наносять на поверхню нижньої призми за допомогою піпетки 3-4 краплі дистильованої води. Встановлюють окуляр так, щоб ясно видно була шкала та візирна лінія, розташована в окулярній частині зорової труби. Рукоятку окуляра обертають до збігу візирної лінії з лінією поділу світлої та темної частин поля. При правильній установці приладу на нуль лінія розділу світла і тіні при 20°C повинна відповідати нульовому поділу шкали відсотків сухих речовин і значення коефіцієнта заломлення води, що дорівнює 1,333.

Після перевірки приладу, на суху поверхню вимірювальної призми наносять 2-3 краплі досліджуваного сусла, закривають камеру і вимірюють. На шкалі показань відсотків сухих речовин за положенням лінії розділу визначають результат відліку та концентрацію цукрів у суслі за допомогою табл. 3.

На автоматизованих приймальних пунктах точність показань автоматичного рефрактометра перевіряють періодично, порівнюючи результати визначення масової концентрації цукрів однієї і тієї ж проби сусла рефрактометром з результатами хімічного методу прямого титрування за ДСТУ 7669:2014. Розбіжності між зазначеними методами не повинні перевищувати 0,5 г/л.

Таблиця 4. Визначення концентрації цукрів у виноградному суслі за вмістом сухих речовин, вираженим у масових відсотках сахарози

Сухі речовини, %	Концентрація цукрів, г/дм ³	Сухі речовини, %	Концентрація цукрів, г/дм ³	Сухі речовини, %	Концентрація цукрів, г/дм ³
10,0	82,0	16,6	154,0	23,2	229,0
10,2	84,0	16,8	156,0	23,4	231,0
10,4	86,0	17,0	158,0	23,6	233,0
10,6	88,0	17,2	160,0	23,8	236,0
10,8	90,0	17,4	162,0	24,0	238,0
11,0	92,0	17,6	165,0	24,2	240,0
11,2	95,0	17,8	167,0	24,4	243,0
11,4	97,0	18,0	169,0	24,6	245,0
11,6	99,0	18,2	171,0	24,8	247,0
11,8	101,0	18,4	173,0	25,0	249,0
12,0	103,0	18,6	176,0	25,2	251,0
12,2	105,0	18,8	178,0	25,4	253,0
12,4	107,0	19,0	180,0	25,6	255,0
12,6	109,0	19,2	182,0	25,8	258,0
12,8	111,0	19,4	184,0	26,0	261,0
13,0	114,0	19,6	186,0	26,2	263,0
13,2	116,0	19,8	188,0	26,4	265,0
13,4	118,0	20,0	191,0	26,6	268,0
13,6	120,0	20,2	194,0	26,8	270,0
13,8	122,0	20,4	196,0	27,0	272,0
14,0	124,0	20,6	198,0	27,2	274,0
14,2	127,0	20,8	200,0	27,4	276,0
14,4	130,0	21,0	203,0	27,6	278,0
14,6	132,0	21,2	205,0	27,8	281,0
14,8	134,0	21,4	207,0	28,0	284,0
15,0	136,0	21,6	210,0	28,2	287,0
15,2	138,0	21,8	213,0	28,4	290,0
15,4	140,0	22,0	215,0	28,6	293,0
15,6	142,0	22,2	217,0	28,8	295,0
15,8	144,0	22,4	220,0	29,0	297,0
16,0	146,0	22,6	222,0	29,2	300,0
16,2	149,0	22,8	225,0	—	—
16,4	151,0	23,0	227,0	—	—

Дослід 6. Визначення інвертного цукру у мелясі за Офнером.

ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

За методом Офнера редукуюча речовина містить CuSO_4 , сегнетову сіль, а замість їдкого натру в розчин вводять соду, щоб зменшити концентрацію йонів OH^- . Це дає можливість запобігти окисненню сахарози і є головною перевагою методу Офнера, сегнетова сіль не відновлює Купрум (II), а відновлення редукуючих речовин відбувається дещо повільніше.

Для освітлення меляси використовують розчини Герлеса, або свинцевий оцет.

Приготування реактивів: Розчин Офнера: насипають у склянку ємністю 100 мл 5.0 г перекристалізованого CuSO_4 , розчиняють в 50-60 мл дистильованої води і кількісно переносять у мірну колбу ємністю 1000 мл.

У стакан ємністю 1000 мл насипають 300 г дрібнокристалічної сегнетової солі, 10 г NaHCO_3 і 50 г Na_2HPO_4 доливають 500 мл дистильованої води нагрітої до 50°C . Для пришвидшення розчинення суміш перемішують скляною паличкою і кількісно переносять у мірну колбу з розчином CuSO_4 і за температури 20°C доводять дистильованою водою до мітки, ретельно перемішують і фільтрують через паперовий фільтр. Розчин повинен бути абсолютно прозорим.

Реактив зберігають у посудині із темного скла з притертою пробкою.

Розчин Герлеса I: 340 г $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ розчинити у мірній колбі на 1000 мл.

Розчин Герлеса II: 32 г NaOH розчинити у мірній колбі на 1000 мл.

Приготування 0.0323N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. 4.0 г кристалічного $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ розчиняють в 500 мл води і одержують 0,0323 н розчин.

Освітлення меляси. Наважку меляси масою 65.0 ± 0.01 кількісно переносять у колбу ємністю 250 мл. Ополіскують водою ($45-50^\circ\text{C}$) Об'єм меляси разом із ополосканою водою повинен становити приблизно 150 мл. Якщо меляса є лужною, то її нейтралізують 1N оцтовою кислотою до слабокислої реакції по лакмусу.

Отриманий розчин охолоджують до 20°C . Приливають 5 мл розчину Герлеса I і через 15-20 секунд розчину Герлеса II. Суміш перемішують, процедуру додавання розчинів Герлеса повторюють 5-6 разів. На освітлення витрачається до 40 мл кожного розчину.

Після освітлення вміст колби доводять дистильованою водою з температурою 20°C майже до мітки; піну видаляють каплею ефіру і доливають воду точно до мітки. Краплі води на шийці витирають фільтрувальним папером. Після цього вміст колби ретельно перемішують і фільтрують через сухий паперовий фільтр. Перші краплі фільтрату виливають. Якщо отриманий фільтрат непрозорий, то його повторно фільтрують до отримання прозорого фільтрату

Для видалення із розчину надлишку йонів Плюмбуму на кожні 100 мл фільтрату додають 0.9 г порошку $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. Рідину енергійно збовтують до повного розчинення кристалів $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. Для додаткового освітлення на кожні 100 мл суміші додають по 0.2 г дітіоніт натрію ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) або бісульфіт натрію (NaHSO_3). Розчин перемішують і залишають на 20 хвилин, потім знову збовтують і фільтрують як описано вище.

Отриманий прозорий розчин придатний для визначення інвертного цукру.

Матеріали, обладнання та реактиви:

- | | |
|-------------------------------------|--|
| 1) мірна колба на 100 мл; | 7) 0.0323N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; |
| 2) конічна колба на 150 мл – 2 шт.; | 8) 0.0323N J; |
| 3) піпетка на 10 мл – 2 шт.; | 9) реактив Офнера; |
| 4) бюретка на 25 мл; | 10) освітлений розчин меляси; |
| 5) тальк; | 11) 0.5% розчин крохмалю; |
| 6) 1N HCl; | 12) електроплита. |

Хід роботи. Освітлений розчин меляси розбавляють у 10 раз, щоб вміст інвертного цукру не перевищував 7.5 мг в 25.0 мл. Для цього 10 мл освітленого розчину меляси переносять піпеткою у мірну колбу на 100 мл і доливають до мітки дистильованою водою.

У дві 150 мл конічні колби набирають піпеткою по 25 мл розбавленого розчину меляси, доливають по 25 мл реактиву Офнера і на кінчику скальпеля висипають тальк. Одну колбу нагрівають впродовж 4-5 хвилин до кипіння і підтримують помірне кипіння рівно 7 хвилин (можна включати і виключати електроплитку). Потім **не збовтуючи** охолоджують холодною водою до 20°C. В обидві колби доливають по стінці (**обережно**) по 7.5 мл 1N HCl і відразу доливають із бюретки 20 мл 0.0323N J.

Колби закривають пробкою (скляною або корковою) і залишають на дві хвилини періодично перемішуючи вміст шляхом обертання. Рівно через дві хвилини надлишок йоду відтитровують 0.0323N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Перед завершенням титрування, коли розчин стане світло-жовтим, в нього доливають 2.5 мл 0.5% розчину крохмалю і продовжують титрувати до переходу синього зафарбування у зелене або бронзове.

Колба без кип'ятіння є контрольною для встановлення поправки на окиснювання йодом нецукрових речовин меляси.

Примітка. Під час кип'ятіння досліджуваного розчину з реактивом Офнера необхідно слідкувати тим, щоб кипляча суміш мала голубуватий колір (це свідчить про надлишок мідного купоросу). Якщо у киплячому розчині відсутній надлишок мідного купоросу, то аналіз необхідно повторити зменшивши кількість розчину меляси (наприклад 10 мл доповнити до об'єму 25 мл дистильованою водою).

При розрахунку вмісту інвертного цукру необхідно враховувати зміну об'єму аналізованого розчину. Відомо, що 1.0 мл 0.0323N J відповідає 1.0 мг інвертного цукру. Масову долю інвертного цукру (Інв, %) вираховують за формулою:

$$\text{Інв} = (V_k - V_p) \cdot a \cdot b // 10v \cdot \gamma, \% \text{ маси},$$

де V_k – об'єм 0.0323N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ у контрольному досліді, мл;

V_p – об'єм 0.0323N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ у робочому досліді мл;

a – об'єм, в якому розбавлена наважка меляси (250) мл;

b – величина розбавлення освітленого розчину меляси (10);

v – наважка меляси (65.0 г);

γ – об'єм розбавленого розчину взятого для визначення інвертного цукру.

3.2. ВИЯВЛЕННЯ І ВИЗНАЧЕННЯ РІВНЯ ПРОДУКТІВ РЕАКЦІЙ РІЗНИХ ТИПІВ БРОДІННЯ

Дослід 1. Визначення вмісту етанолу в пиві дистиляційним методом

Матеріали та обладнання:

- | | |
|------------------------------|-------------------------------|
| 1) пиво пляшкове і розливне; | 4) колба на 500.0 мл – 4 шт.; |
| 2) прилад для перегонки; | 5) технічна вага; |
| 3) електроплита; | 6) пікнометр. |

Хід роботи. Для визначення вмісту етанолу проводять перегонку пива. Перед початком перегонки колбу-приймач зважують на технічних вагах з точністю до 0,1 г. Потім в колбу для перегонки наливають 200 г пива, з якого усунули вуглекислий газ. Для цього його струшують при кімнатній температурі, а потім кількакратно переливають з однієї хімічної склянки в іншу. В колбу-приймач наливають 10-15 мл дистильованої води і починають перегонку пива. Перегонку закінчують, коли в колбі-приймачі збереться $\frac{2}{3}$ - від цілого об'єму пива, що взяли для перегонки. Приймач ставлять на вагу, зважують і доливають дистильованою водою до маси рідини 200 г. Потім вміст приймача перемішують і за допомогою пікнометру визначають густину при 20°C.

Примітка. По значенню густини, користуючись таблицею, знаходять відповідний вміст алкоголю в пиві.

Дослід 2. Якісна реакція на етанол.

Матеріали, обладнання та реактиви:

- | | |
|---------------------------|------------------------------|
| 1) відгон з дослідів 1; | 4) піпетки на 10 мл – 2 шт.; |
| 2) 20% NaHCO_3 ; | 5) водяна баня; |
| 3) порошок металевого J; | 6) мікроскоп. |

Хід роботи. Відбирають 10 мл відгону в досліді 1 додають до нього 10 мл 20%-вого розчину соди і 0,1.0 г порошку металевого йоду. Нагрівають на водяній бані при 60°C до повного розчинення йоду. З охолодженого розчину випадають дрібні, у вигляді сніжинок і пластинок, кристали йодоформу (CHI_3) із характерним запахом. Отриманий в результаті реакції осад розглядають під мікроскопом. Мікроскопічну картину замальовують у протоколі.

Дослід 3. Рефрактометричне визначення етанолу в пиві.

ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Рефрактометричний метод дозволяє досить точно встановлювати вміст етанолу в пиві. Визначення ґрунтується на припущенні, що в пиві у відносно вузьких межах масової частки етанолу щільність пива й показник переломлення є аддитивними величинами. Аналіз полягає у вимірюванні щільності й показника переломлення пива.

Матеріали та обладнання: рефрактометр типу УРЛ або РПЛ-3 з ультратермостатом, набір ареометрів, водяна баня, кристалізатор, мірний циліндр місткістю 250 мл, хімічна склянка місткістю 250 мл, скляна паличка, краплинна піпетка, пиво.

Хід роботи: Попередньо перевіряють точність і надійність роботи рефрактометра по дистильованій воді при 20°C. Постійну температуру забезпечує ультратермостат. Вимірюють показник переломлення після термостатування призми протягом 15 хв. Показник переломлення дистильованої води в стандартних умовах = 1,333, що відповідає масовій частці сухих речовин по правій шкалі 0%.

Аналізоване пиво поміщають у хімічну склянку, звільняють від діоксиду вуглецю нагріванням на водяній бані й ретельним перемішуванням проби скляною паличкою. Пиво охолоджують у кристалізаторі 15 хв до 20°C, переливають у мірний циліндр й ареометром вимірюють щільність (ρ , г/см³).

Декілька крапель аналізованого пива піпеткою поміщають на вимірювальну призму рефрактометра, опускають освітлювальну призму, термостатують призменний блок протягом 15 хв і вимірюють показник переломлення при 20 °C. Виміри повторюють не менш трьох разів, обчислюють середнє значення .

Масову частку спирту в пиві (ω , %) розраховують по емпіричному рівнянню Берглунда, Емлінгтона й Расмуссена:

$$\omega = 0.2691(n_D^{20} - 14.5) - 2.774(p - 1)1000 + 0.323$$

Дослід 3. Якісні реакції на молочну кислоту

Матеріали, обладнання та реактиви:

- | | |
|-----------------------------|---|
| 1) центрифуга; | 4) 10% H_2SO_4 ; |
| 2) конічна колба на 100 мл; | 5) 2% KMnO_4 ; |
| 3) піпетка 10 мл; | 6) Реактив Толленса $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]\text{OH}$. |

Хід роботи. (Варіант 1 – переведення молочної кислоти в альдегід)

Молочнокислий затор центрифугуванням звільняють від осаду; супернатант у кількості 5-7 мл вносять у 100-мілілітрову конічну колбу, додають туди 1 мл 10% H_2SO_4 і нагрівають до кипіння. Додають краплями 2%-вий розчин KMnO_4 . Молочна кислота переходить в оцтовий альдегід. Останній виявляють за допомогою фільтрувального паперу, просоченого $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]\text{OH}$ (реактив Толленса). Для цього фільтрувальним папером покривають шийку колби, у якій проводять визначення: від дії оцтового альдегіду на $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]\text{OH}$ папірець чорніє.

(Варіант 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.

Дослід 4. Якісне виявлення масляної кислоти.

Матеріали, обладнання та реактиви:

- | | |
|-------------------------------------|------------------------------------|
| 1) центрифуга; | 4) конц. H_2SO_4 |
| 2) центрифужні пробірки на 10.0 мл; | 5) 96%-вий етанол; |
| 3) газовий пальник; | 6) 5%-вий розчин FeCl_3 . |

Хід роботи. (Варіант 1) В пробірку до 5 мл відцентрифугованої культуральної рідини додають 0,5 мл 96%-го етанолу і 1-2 краплі концентрованої H_2SO_4 . Суміш нагрівають у полум'ї пальника, обережно збовтуючи; при цьому виділяється характерний запах масляно-етанолового етеру (запах ананаса).

(Варіант 2) До 5 мл збродженого субстрату додають 2 мл 5%-го розчину FeCl_3 . Суміш нагрівають у полум'ї пальника. При нагріванні утворюється коричневе забарвлення внаслідок утворення маслянокислого заліза. Масляна кислота також легко розпізнається за характерним для неї запахом прогірклої олії.

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

Дослід 5. Виявлення ацетоїну.

ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Ацетоїн (ацетилметилкарбінол) виявляють в реакції Фогес-Проскуера, згідно якої ацетоїн в лужному середовищі окиснюється в диацетил. Останній реагує з гуанідиною групою аргініну, що міститься в пептоні. Утворення комплексної сполуки супроводжується виникненням червоного забарвлення.

Матеріали, обладнання та реактиви:

- | | |
|---------------------------------------|--|
| 1) пиво без CO_2 і мутності; | 4) піпетки на 1.0 мл-2шт; |
| 2) конічна колба на 100.0 мл; | 5) 20% KOH ; |
| 3) циліндр на 50 мл; | 6) 10% спиртовий р-н β -нафтолу. |

Хід роботи. В конічну колбу на 100мл вносять 50 мл пива, додають 1 мл свіжого 10% спиртового розчину β -нафтолу і 1 мл 20% KOH , добре перемішують. В присутності ацетоїну відразу з'являється червоне забарвлення.

4. ОЦІНКА ПРОДУКЦІЇ БРОДИЛЬНИХ ВИРОБНИЦТВ

Дослід 1. Визначення кислотності пива титриметрично.

Підготовка пива для аналізу. Непрозоре пиво відфільтровують. Кислотність визначають прямим титруванням з використанням фенолфталеїну в якості індикатора.

Матеріали, обладнання та реактиви:

- | | |
|-------------------------|-------------------------------------|
| 1) відфільтроване пиво; | 4) циліндр на 50 мл; |
| 2) бюретка на 50 мл; | 5) конічна колба на 200 мл – 2 шт.; |
| 3) 0.1N NaOH; | 6) 1% спиртовий р-н фенолфталеїну. |

Хід роботи. 100 мл попередньо відфільтрованого пива вносять у конічну колбу на 200 мл і додатково звільняють ще й від вуглекислоти шляхом нагрівання протягом 30 хв при 40°C і періодичному струшуванні. Перед титруванням пиво охолоджують. 50 мл звільненого від вуглекислоти пива циліндром наливають в конічну колбу ємністю 200 мл і титрують 0.1N NaOH до знебарвлення фенолфталеїну. Вміст оцтової кислоти (%) вираховують за формулою:

$$X = 100 \cdot V \cdot k \cdot 0,06 / a;$$

де: а – об'єм пива, мл;

100 – перехід в %;

k – поправочний коефіцієнт;

V – об'єм 0.1N NaOH, що пішов на титрування, мл;

0,06 – маса оцтової кислоти, що відповідає 1мл 0.1N NaOH, г.

Примітка: При спиртовому бродінні із цукрів у невеликих кількостях утворюються вторинні продукти і серед них кислоти, зокрема: оцтова, бурштинова, молочна та цитринова. Оскільки, найбільшу частку серед кислот пива становить оцтова кислота, тому розрахунок проводиться на її вміст. На титрування 50 мл доброякісного пива іде 9 мл 0.1N NaOH.

Дослід 2. Визначення піностійкості пива.

Під стійкістю піни розуміють час, який минув з моменту її виникнення до повного руйнування.

Хід роботи. У чистий скляний посуд наливають пиво з температурою 12°C з висоти 25 мм (віддаль, від горловини пляшки до верхнього краю посудини). Наливання припиняють, коли верхня поверхня піни зрівняється з верхнім краєм посудини. Лінійкою вимірюють висоту піни, а секундоміром – час спадання піни. Контроль часу припиняють, коли на поверхні піни утворюються невеликі вільні площі ділянки. Стійкість піни виражають у хв.

Дослід 3. Якісне виявлення альдегідів у пиві.

В процесі варіння пива утворюються альдегіди і найбільше оцтового.

Матеріали, обладнання та реактиви:

- 1) реактив Фелінга; 3) 0.5% резорцин;
- 2) конц. H_2SO_4 ; 4) пиво звільнене від мутності та вуглекислоти.

3.1. Проба з реактивом Фелінга.

Хід роботи. В пробірку наливають 5 мл пива, додають 2 краплі реактиву Фелінга та обережно нагрівають. Розчин стає оранжево-жовтим, а відтак випадає осад червоного кольору.

3.2 Проба з резорцином.

Хід роботи. В пробірку наливають 1 мл пива додають 1 мл 0,5% розчину резорцину; одержану суміш обережно по стінці виливають в нахилену пробірку з 3.0 мл конц. H_2SO_4 . На поверхні розділу фаз спостерігається червоно-фіолетове забарвлення, відтак – білий осад, який поступово переходить в червоно-фіолетовий.

Список використаної літератури

1. Біотехнологія бродіння : методичні вказівки для виконання лабораторних робіт для студентів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти за спеціальністю 162 “Біотехнології та біоінженерія” / Уклад.: Н. Л. Заярнюк, А. М. Кричковська, Л. Р. Журахівська, О. В. Швед, В. П. Новіков. Львів : Вид-во Львівської політехніки, 2020. 64 с.
2. ДСТУ 3698 – 98. Меляса бурякова. Технічні умови.
3. ДСТУ 7259-2012. Хімічні реактиви. Методи готування для окиснювально-відновного титрування та визначення їх молярної концентрації.
4. ДСТУ 7381:2013. Визначення вмісту молочного цукру (лактози) в молоці йодометричним методом.
5. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з курсу «Сучасне застосування біотехнологічних методів» для студентів 7.092902 «Біотехнологія біологічно активних речовин» та студентів магістерського рівня навчання спеціальності 8.092902 «Біотехнологія біологічно активних речовин». Упорядники: Швед О.В., Петріна Р.О., Губрій З.В., Новіков В.П. Львів : НУ «ЛП», 2005, 72 с.
6. Технологія продуктів мікробного синтезу: методичні вказівки до виконання лабораторних робіт для студентів спеціальності 162 Біотехнологія та біоінженерія. Уклад.: Л.Б. Орябінська, Л.П. Дзигун, В.Ю. Поліщук. Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2017. 40 с.
7. Методичні вказівки до лабораторних робіт з дисципліни «Методи аналізу в біотехнології» освітньо-професійної програми першого (бакалаврського) рівня вищої освіти зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» усіх форм навчання. Укл.: Головей О.П., Філімоненко О.Ю. Кам'янське, ДДТУ, 2017. 43 с.
8. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з дисципліни «Хімія і біохімія вина» для здобувачів СВО «Бакалавр» денної та заочної форм навчання, галузі знань 18 «Виробництво та технології», спеціальності 181 «Харчові технології», освітньої програми «Технології продуктів бродіння та виноробства» / Укл. О.Б. Ткаченко, Т.С. Сугаченко, О.М. Кананихіна та ін.. Одеса : ОНТУ, 2022. 51 с.

9. Фіалковська Л.В., Мельник М.О. Технологія бродильних виробництв. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт для студентів денної та заочної форми навчання напряму підготовки 6.051701 «Харчові технології та інженерія». Вінниця : ОЦ ВНАУ, 2018. 29 с.
10. Gerhard Gottschalk. Bacterial Metabolism Second Edition / Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg. 1986/ 281 p. <https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1072-6>