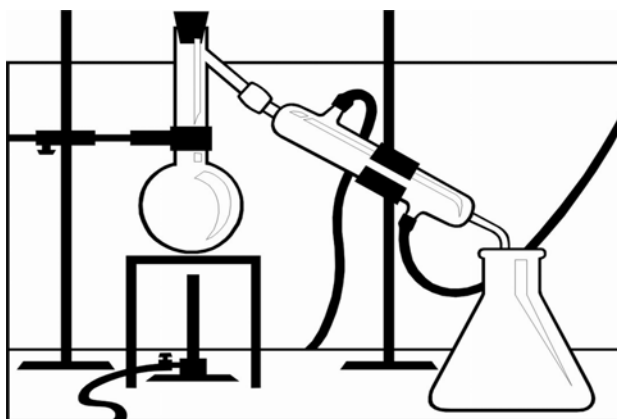


Е.И. МУРАТОВА, О.В. ЗЮЗИНА,  
О.Б. ШУНЯЕВА

---

# БИОТЕХНОЛОГИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ И БЕЛКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ



---

◆ ИЗДАТЕЛЬСТВО ТГТУ ◆

УДК 663.18(075)  
ББК Л791я73  
М91

Р е ц е н з е н т ы:

Кандидат сельскохозяйственных наук,  
заместитель директора плодовоовощного института  
Мичуринского государственного аграрного университета  
*З.Н. Тарова*

Кандидат химических наук,  
доцент кафедры химической технологии органических веществ  
*Т.П. Дьячкова*

**Муратова, Е.И.**

М91 Биотехнология органических кислот и белковых препаратов:  
учебное пособие / Е.И. Муратова, О.В. Зюзина, О.Б. Шуняева. –  
Тамбов : Изд-во Тамб. гос. техн. ун-та, 2007. – 80 с. – 100 экз. –  
ISBN 978-5-8265-0655-4.

Представлены теоретические основы технологии органических кислот, ферментных препаратов и белковых изолятов. Рассмотрены технологические приемы биосинтеза, выделения, концентрирования и очистки биомассы и продуктов метаболизма в лабораторных условиях. Приведены вопросы для контроля знаний теоретических основ биотехнологии и техники лабораторных работ.

Предназначено для студентов 4 курса специальности 240902 "Пищевая биотехнология".

УДК 663.18(075)  
ББК Л791я73

ISBN 978-5-8265-0655-4 © ГОУ ВПО "Тамбовский государственный  
технический университет" (ТГТУ), 2007  
Министерство образования и науки Российской Федерации  
ГОУ ВПО "Тамбовский государственный технический университет"

Е.И. Муратова, О.В. Зюзина, О.Б. Шуняева

# **БИОТЕХНОЛОГИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ И БЕЛКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ**

Утверждено Ученым советом университета  
в качестве учебного пособия для студентов 4 курса  
специальности 240902 "Пищевая биотехнология"



---

Тамбов  
Издательство ТГТУ  
2007

Учебное издание

МУРАТОВА Евгения Ивановна,  
ЗЮЗИНА Ольга Владимировна,  
ШУНЯЕВА Оксана Борисовна

## БИОТЕХНОЛОГИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ И БЕЛКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ

Учебное пособие

Редактор З.Г. Чернова  
Инженер по компьютерному макетированию М.Н. Рыжкова

Подписано в печать 07.12.2007.  
Формат 60 × 84/16. 4,65 усл. печ. л. Тираж 100 экз. Заказ № 793

Издательско-полиграфический центр  
Тамбовского государственного технического университета  
392000, Тамбов, Советская, 106, к. 14

## ВВЕДЕНИЕ

---

Биотехнология – междисциплинарная область научно-технического прогресса, возникшая на стыке биологических, химических и технических знаний, целью которой является промышленное производство товаров и услуг с использованием живых организмов, биологических систем и процессов. Важной отраслью биотехнологии является пищевая биотехнология, которая направлена на решение проблем дефицита продуктов питания, повышения их качества и разработки новых пищевых продуктов с использованием биотехнологических методов и приемов.

В учебном пособии представлен ряд традиционных и новых направлений пищевой биотехнологии.

К традиционным направлениям пищевой биотехнологии относится получение органических кислот – лимонной, молочной, яблочной, уксусной, янтарной, которые широко используются в пищевой промышленности в качестве регуляторов кислотности и консервантов. В теоретической части пособия рассмотрен химизм образования уксусной, лимонной и молочной кислот, приведены эскизные схемы их получения, основные характеристики стадии биосинтеза. Целью лабораторных работ является формирование у студентов практических навыков биосинтеза органических кислот и изучение влияния состава питательных сред на выход целевого продукта.

К новым направлениям пищевой биотехнологии, представленным в пособии, относится получение белковых препаратов, включающих в себя производство ферментов, белковых продуктов, концентратов и изолятов.

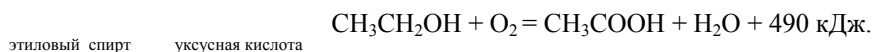
В связи с широким использованием ферментов в различных отраслях пищевой промышленности важным является формирование у будущих специалистов теоретических знаний и практических навыков получения, выделения и очистки ферментных препаратов. В пособии рассмотрены особенности поверхностного и глубинного способов получения ферментных препаратов различной степени очистки. Лабораторные работы посвящены изучению условий твердофазного культивирования и режимов выделения на активность ферментных препаратов.

Наиболее дефицитным компонентом пищи является белок, для получения которого можно использовать процессы биоконверсии растительного и минерального сырья микроорганизмами. В теоретической части пособия приведены эскизные схемы и описаны технологические режимы получения белоксодержащих продуктов с использованием микроорганизмов и их ферментных систем. Лабораторный практикум позволяет студентам получить навыки выделения белковых препаратов и определения их физико-химических характеристик.

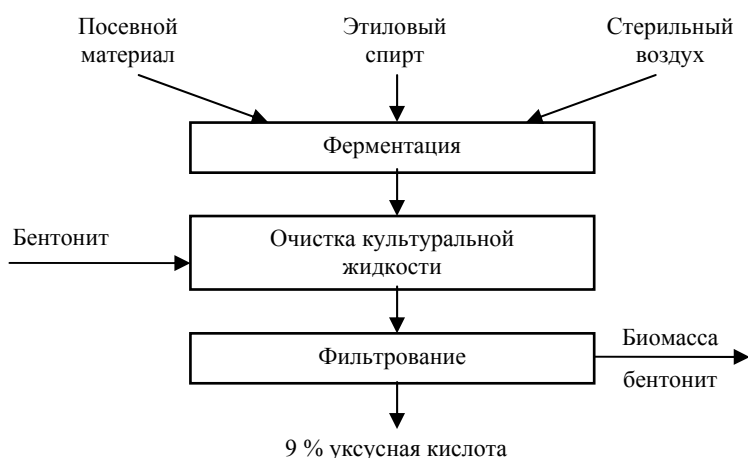
### 1. БИОТЕХНОЛОГИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ

Несмотря на значительный прогресс в области органического синтеза многие кислоты (лимонная, молочная, итаконовая, уксусная и др.) получают в настоящее время микробиологическим синтезом. Органические кислоты находят широкое применение в фармацевтической, химической, текстильной и других отраслях промышленности. Пищевая промышленность традиционно является основным потребителем лимонной, уксусной и молочной кислот, так как продукты естественного брожения более предпочтительны, чем синтетические кислоты в связи с безвредностью для организма человека содержащихся в них примесей.

Для получения пищевой уксусной кислоты используется способность уксуснокислых бактерий окислять этиловый спирт до уксусной кислоты. Реакцию образования уксусной кислоты катализирует окислительный фермент алкогольоксидаза. Этот сложный многоступенчатый процесс выражается суммарным уравнением



Эскизная схема производства уксусной кислоты представлена на рис. 1.1.

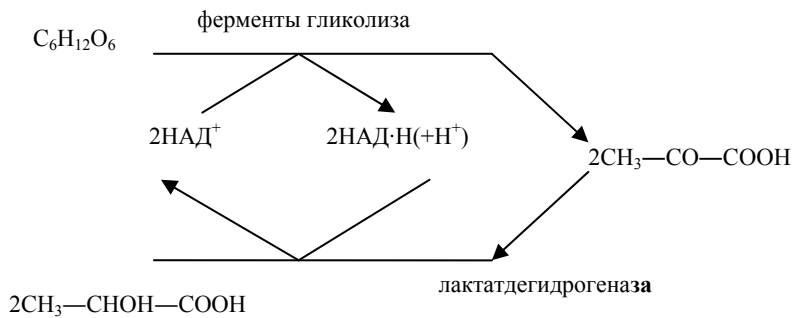


**Рис. 1.1. Схема производства уксусной кислоты  
1.1. Основные характеристики биотехнологической стадии  
производства уксусной кислоты**

Параметры стадии	Значения параметров
Продуценты	<i>Bacterium Schutzenbachii</i> , <i>Bacterium Curvum</i>
Компоненты питательной среды	Этиловый спирт, хлорид аммония, сульфат магния, монофосфат калия
рН питательной среды	3,0...3,2
Температура культивирования	28 → 25 °С
Режим аэрации	0,35...0,4 → 0,1...0,15 м <sup>3</sup> /м <sup>3</sup> ·мин
Продолжительность культивирования	7...10 суток
Содержание уксусной кислоты в культуральной жидкости	От 6...7 % до 9...14 %

Основные характеристики биотехнологической стадии производства уксусной кислоты представлены в табл. 1.1.

Молочная кислота  $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$  образуется в результате анаэробного превращения углеводов молочнокислыми бактериями. Схема биосинтеза молочной кислоты



В промышленных условиях пищевую молочную кислоту получают методом глубинного культивирования с помощью гомоферментативных термофильных бактерий. Эскизная схема производства молочной кислоты представлена на рис. 1.2.



Рис. 1.2. Схема производства молочной кислоты

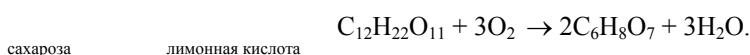
## 1.2. Основные характеристики биотехнологической стадии производства молочной кислоты

Параметры стадии	Значения параметров
Продуценты	Lactobactliiy casei, Lactobacterium delbrucki
Компоненты питательной среды	Меласса, гидролизаты крахмала, биологически активные вещества
pH питательной среды	6,3...6,5
Температура культивирования	50 °C
Продолжительность культивирования	7...10 суток
Содержание молочной кислоты в культуральной жидкости	18...20 %

Основные характеристики биотехнологической стадии производства молочной кислоты представлены в табл. 1.2.

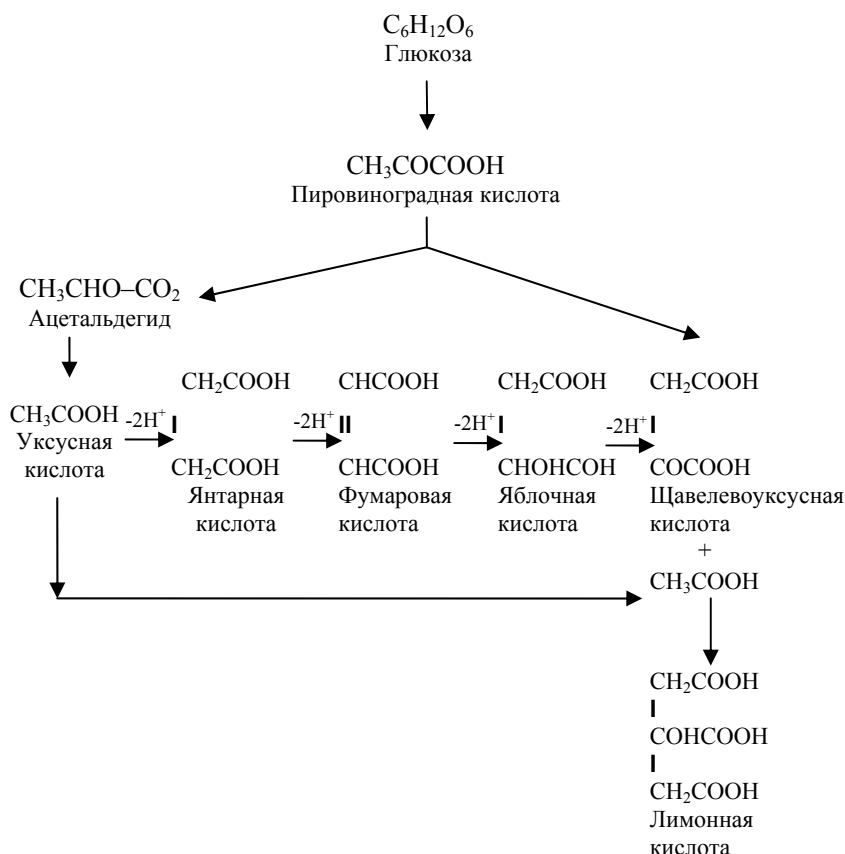
Лимонная кислота широко распространена в плодах и ягодах. Она находит применение в пищевой, химической и текстильной промышленности, медицине.

Производство лимонной кислоты основано на культивировании микроскопических грибов *Aspergillus niger*, которые сбраживают сахара питательной среды, образуя лимонную кислоту. Этот процесс может быть выражен суммарным уравнением



Синтез лимонной кислоты связан с циклом трикарбоновых кислот и происходит в результате конденсации какой-либо кислоты, содержащей четыре атома углерода и две карбоксильные группы, с кислотой, содержащей два атома углерода и одну карбоксильную группу. Химизм образования лимонной кислоты представлен на рис. 1.3.

В результате гликолиза глюкозы образуется пировиноградная кислота. На следующем этапе происходит ферментативное связывание пировиноградной кислоты с диоксидом углерода. Образовавшаяся щавелевоуксусная кислота вступает далее в реакцию с уксусной кислотой и образуется лимонная кислота. Таким образом, химизм образования лимонной кислоты включает реакции гликолиза и ряд реакций, замкнутых в цикл Кребса. При каждом обороте этого цикла молекула щавелевоуксусной кислоты вступает во взаимодействие с молекулой уксусной кислоты, образуя лимонную кислоту.



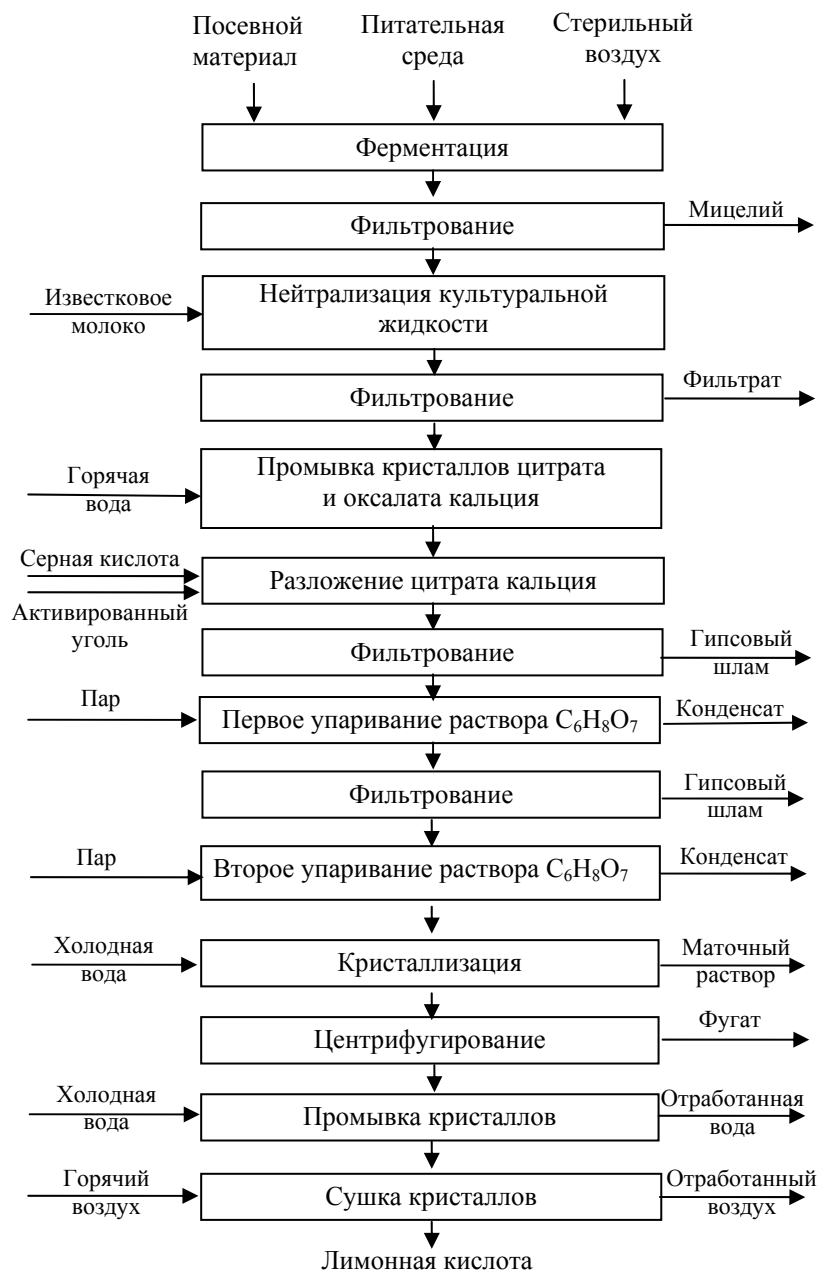
**Рис. 1.3. Химизм образования лимонной кислоты**



Лимонную кислоту получают из мелассы микробиологическим синтезом, применяя главным образом микроскопические грибы *Aspergillus niger*, выращиваемые поверхностным или глубинным способом.

Производство лимонной кислоты включает следующие основные технологические стадии: получение посевного материала, подготовку мелассы к сбраживанию, сбраживание растворов мелассы в лимонную кислоту с последующим отделением мицелия, выделение из сброженных растворов лимонной кислоты, концентрирование лимонной кислоты и получение ее в кристаллическом виде.

Эскизная схема производства лимонной кислоты представлена на рис. 1.4.

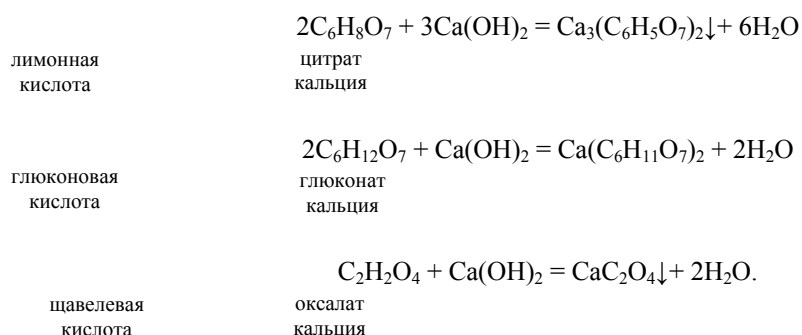


**Рис. 1.4. Схема производства лимонной кислоты**  
**1.3. Основные характеристики биотехнологической стадии**  
**производства лимонной кислоты**

Параметры стадии	Значения параметров
Продуценты	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Varrowia lipolytica</i>
Компоненты питательной среды	Меласса, хлорид аммония, сульфат магния, дифосфат калия
pH питательной среды	7,0...7,2
Температура культивирования	34...36 °C → 32...34 °C
Режим аэрации	15 → 30 м <sup>3</sup> /м <sup>3</sup> ·ч
Продолжительность культивирования	5...7 суток
Содержание лимонной кислоты в культуральной жидкости	5...12 %

Основные характеристики биотехнологической стадии производства лимонной кислоты представлены в табл. 1.3.

Сброженные растворы представляют собой смесь лимонной, глюконовой и щавелевой кислот, несброженного сахара и минеральных примесей. Содержание лимонной кислоты составляет 80..98 % от суммы всех кислот. Ее выделяют из раствора путем связывания катионами кальция с образованием слаборастворимой соли цитрата кальция. При нейтрализации сброженного раствора образуются кальциевые соли лимонной, глюконовой и щавелевой кислот:



Перевод лимонной кислоты в свободное состояние и отделение ее от оксалата кальция достигается обработкой осадка серной кислотой с последующим фильтрованием и промывкой осадка. Отфильтрованный раствор подают на двухстадийное упаривание с промежуточным освобождением от осадка гипса и кристаллизацию. В товарном продукте должно содержаться не менее 99,5 % лимонной кислоты в пересчете на моногидрат.

## 2. BIOTEKHOLOGIJA BELKOVYH PREPARATOV

К группе белковых препаратов, получаемых биотехнологическим способом, относятся ферментные препараты, аминокислоты, белковые концентраты и белковые изоляты. Из перечисленных групп белковых препаратов в пищевой промышленности в настоящее время наиболее широко используются ферментные препараты.

Ферменты обладают уникальными свойствами (эффективность и специфичность действия, нетоксичность, способность работать в мягких условиях, перерабатывать различное сырье растительного и животного происхождения, в том числе и отходы), в связи с чем их применение в промышленности выгодно с экономической и экологической точек зрения. Классификация ферментов по типу катализируемых реакций представлена в табл. 2.1.

### 2.1. Классификация ферментов

Название класса ферментов	Тип катализируемой реакции
Гидролазы	Гидролитическое расщепление сложных органических соединений
Изомеразы	Изомеризация
Лиазы	Негидролитическое расщепление
Лигазы (синтеказы)	Синтез сложных органических соединений
Оксидоредуктазы	Окисление и восстановление
Трансферазы	Перенос атомных группировок от одного соединения к другому

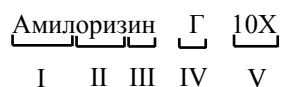
Для крупномасштабного получения ферментов пригодны только некоторые растительные организмы на определенной фазе их развития (проросшее зерно различных злаков и бобовых, сок зеленой массы растений), а также отдельные ткани и органы животных (поджелудочная железа, сычуг крупного рогатого скота). Практически неограниченный источник ферментов – микроорганизмы, содержащие набор большинства известных в настоящее время энзимов, количество которых можно повысить в десятки и сотни раз методами мутагенеза, селекции и индукции биосинтеза.

Из более чем 2000 известных в настоящее время ферментов в промышленности используется около 30. Основная часть ферментов, поступающих на мировой рынок, приходится на долю гидролаз. По прогнозам ученых, основным потребителем ферментов в ближайшем будущем останется пищевая промышленность. Главное место среди ферментов для пищевой промышленности занимают глюкоизомераза и глюкоамилаза, применяющиеся для получения обогащенных фруктозой сиропов и составляющие около 50 % рынка пищевых энзиматических препаратов. Все большее развитие в пищевой промышленности получают технологические процессы с участием сложных энзиматических систем, включающих коферменты. Примеры применения ферментов в пищевой промышленности приведены в табл. 2.2.

## 2.2. Применение ферментов в пищевой промышленности

Ферменты	Продуценты ферментов	Назначение
Амилазы	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus mesentericus</i>	Снижение вязкости теста, осахаривание заторов
Протеазы Липазы	<i>Aspergillus terricola</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Тендеризация мяса, получение рыбных гидролизатов
Пектиназы	<i>Aspergillus awamori</i> , <i>Aspergillus foetidus</i> , <i>Clostridium pectinifermetans</i>	Осветление вин, соков
Глюко- изомеразы	<i>Aspergillus awamori</i>	Получение глюкозофруктозных сиропов из крахмала
Целлюлазы	<i>Trichoderma viride</i>	Биодеградация отходов пищевых производств

Препараты ферментов, вырабатываемые промышленностью, кроме основного фермента (комплекса ферментов) содержат различные балластные вещества. Название ферментных препаратов складывается из сокращенного названия основного фермента и видового названия микроорганизма-продуцента. Например, препарат, содержащий в своей основе амилотические ферменты и полученный при помощи культуры *Aspergillus oryzae*, называется амилоризин. В названии препарата указывается также способ культивирования и степень концентрирования и очистки:



I – название основного фермента; II – название микроорганизма-продуцента; III – окончание; IV – способ культивирования: "П" – поверхностный, "Г" – глубинный; V – степень очистки (концентрирования): "X" – поверхностная культура или культуральная жидкость; "2X" – концентрированные растворы ферментов, освобожденные от биомассы; "3X" – высушенные препараты "2X"; "10X" – осажденные органическими растворителями и солями; "15X" – "30X" – очищенные от балластных веществ и других ферментов с использованием различных методов очистки и фракционирования.

Производство ферментных препаратов микробного происхождения может осуществляться поверхностным и глубинным методами.

Поверхностный метод заключается в культивировании микроорганизмов на поверхности увлажненной стерилизованной сыпучей питательной среды, размещенной в кюветках. Инкубацию микроорганизмов ведут в специальном термостатируемом цехе при постоянном контроле в нем температуры, влажности и расхода воздуха. Основные параметры поверхностного способа получения ферментов приведены в табл. 2.3.

## 2.3. Поверхностный способ производства ферментов

Параметры стадии	Значения параметров
Продуценты	Микроскопические грибы родов <i>Aspergillus</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Mucor</i> , <i>Fusarium</i>
Компоненты питательной среды	Пшеничные отруби, солодовые ростки, свекловичный жом, пивная дробина, опилки (W = 58...60 %)
Температура культивирования	30...32 → 28...30 °C
Режим аэрации	Кондиционированный воздух W от 98...99 до 92...94 % и температурой от 30...32 °C до 28...30 °C, расход 0,1...0,2 м <sup>3</sup> / кг·ч
Продолжительность культивирования	От 36 до 52 ч в зависимости от продуцента
Содержание ферментов	0,006...0,007 % от массы сухих веществ

Для выращивания продуцентов ферментов глубинным методом в промышленных условиях используют ферментаторы из нержавеющей стали, снабженные устройствами для перемешивания и подачи в жидкую питательную среду стерильного воздуха.

Сначала ферментатор заполняют питательной средой, стерилизуют ее, затем засевают чистой культурой, подаваемой из специального генератора. Для предотвращения инфицирования в ферментере поддерживают повышенное давление наряду с оптимальными значениями pH, температуры, окислительно-восстановительного потенциала и другими условиями культивирования. Основные параметры глубинного способа получения ферментов приведены в табл. 2.4.

#### 2.4. Глубинный способ производства ферментов

Параметры стадии	Значения параметров
Продуценты	Микроскопические грибы родов <i>Aspergillus</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Mucor</i> , <i>Fusarium</i> , бактерии родов <i>Baccillus</i> и <i>Clostridium</i>
Компоненты питательной среды	Кукурузная мука, крахмал, патока, гидролизаты казеина, дрожжей, древесины, минеральные соли (содержание СВ от 1,5 до 15,5, pH от 3,5 до 8,5)
Температура культивирования	26...32 °С для грибов 32...37 для бактерий
Режим аэрации	50...60 м <sup>3</sup> / ч·м <sup>3</sup>
Продолжительность культивирования	От 24 до 54 ч

В настоящее время наиболее прогрессивным признан проточный метод культивирования микроорганизмов, который обеспечивает непрерывную подачу в ферментатор как питательной среды, так и посевного материала. Основное достоинство метода – возможность длительное время поддерживать в автоматическом режиме рост культуры микроорганизмов.

Выделение и очистка ферментов – весьма трудоемкая и дорогостоящая процедура, поэтому если фермент можно использовать в виде неочищенного препарата, его не очищают. Например, в пивоваренной промышленности применяются ферментные препараты, представляющие собой высушенную биомассу плесневых грибов. В большинстве отраслей пищевой промышленности используют очищенные ферментные препараты, частично или полностью освобожденные от балластных веществ. Исходным материалом для получения препаратов ферментов служат: биомасса продуцента, фильтрат культуральной жидкости, экстракт из культуры микроорганизмов.

Неочищенные ферментные препараты получают путем высушивания в мягком режиме культуры микроорганизмов вместе с остатками питательной среды. Такие препараты получают и путем упаривания экстракта из культуры продуцента, выращенного поверхностным способом, или из фильтрата культуральной жидкости в случае глубинного выращивания микроорганизмов. Технические препараты ферментов представляют собой либо высушенные до порошкообразного состояния продукты, либо жидкие концентраты с содержанием 50 % сухих веществ.

Эскизная схема производства неочищенных ферментных препаратов представлена на рис. 2.1.

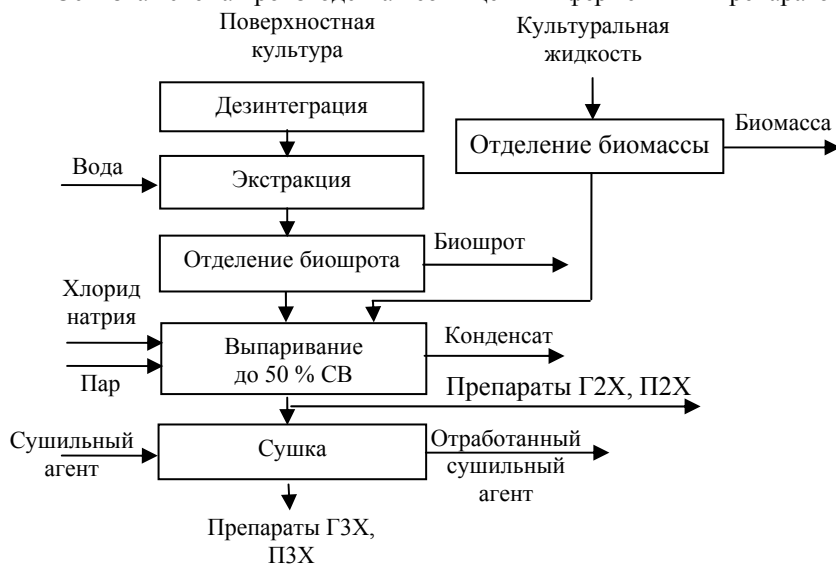


Рис. 2.1. Схема получения препаратов с индексами П2Х, Г2Х, П3Х, Г3Х

Для выделения ферментов из клетки необходимо очень тонкое измельчение исходного материала вплоть до разрушения субклеточных структур. Для этого используют специальные мельницы и гомогенизаторы, а также ультразвук, метод попеременного замораживания и оттаивания биомассы. Для высвобождения ферментов из мембранных структур клетки к гомогенатам добавляют небольшое количество детергентов или обрабатывают их энзимами – лизоцимом, целлюлазой, лецитиназой. Особое внимание при выделении ферментов уделяют проведению всех операций в условиях, исключающих денатурацию белка (нейтральные значения pH, стабилизирующие добавки в виде защитных белков, солей и др.).

В зависимости от свойств выделяемого фермента и сопутствующих ему балластных веществ при получении очищенных ферментных препаратов комбинируют различные приемы и методы, такие, как термическое фракционирование, осаждение органическими растворителями и солями, очистка на молекулярных ситах, ионообменная хроматография,

электрофорез и др. На заключительных этапах очистки часто используют аффинную хроматографию, которая основана на способности ферментов избирательно связывать те или иные лиганды. Очищенные ферментные препараты хранят при низких температурах с добавлением стабилизаторов, в качестве которых используют глицерин, моно и дисахариды, желатин. Эскизные схемы производства очищенных ферментных препаратов, частично освобожденных от балластных веществ представлены на рис. 2.2 и 2.3.

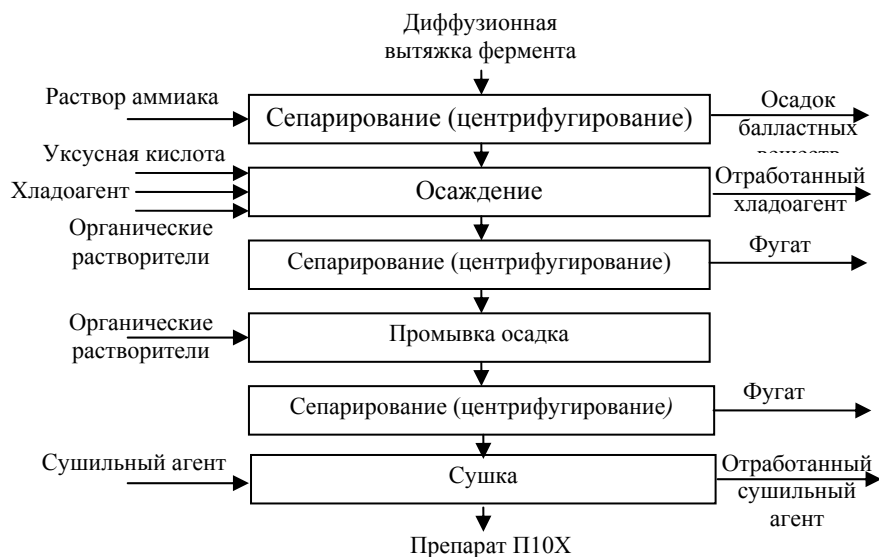


Рис. 2.2. Схема получения препаратов с индексом П10Х

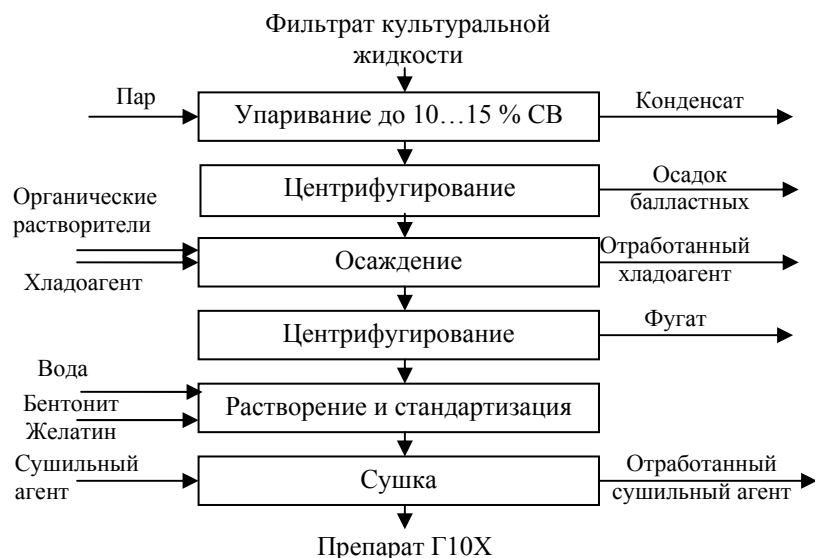


Рис. 2.3. Схема получения препаратов с индексом Г10Х

Схема получения полностью очищенного фермента  $\alpha$ -амилазы в кристаллическом виде представлена на рис. 2.4.

Важным этапом развития инженерной энзимологии стала разработка способов получения и использования иммобилизованных ферментов – искусственно связанных с инертным нерастворимым носителем, но сохраняющих свои каталитические свойства.

В настоящее время иммобилизованные ферменты используются в процессах биоконверсии – превращения одних органических соединений в другие под действием ферментных систем микроорганизмов. В технологии биоконверсии наряду с ферментами широко используют клетки микроорганизмов как в свободном, так и в иммобилизованном состоянии. Классическими примерами биоконверсии служат процессы получения продуктов брожения спиртов, органических кислот (уксусной, молочной, глюконовой, лимонной) из углеводных субстратов, ферментативное превращение глюкозы во фруктозу и т.д.

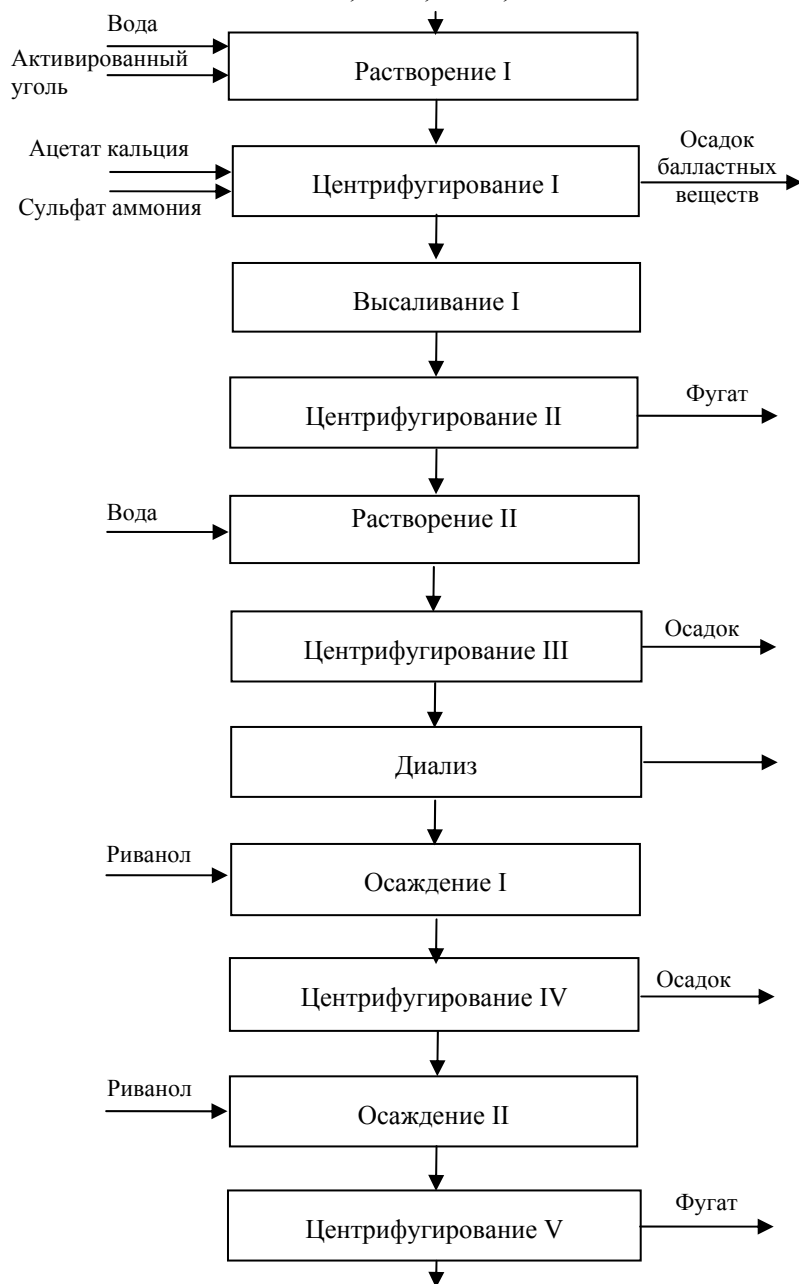
Большинство промышленно важных процессов биоконверсии осуществляется путем многоступенчатого превращения субстрата в конечный продукт с участием нескольких ферментов или ферментных систем. Технологическое преимущество

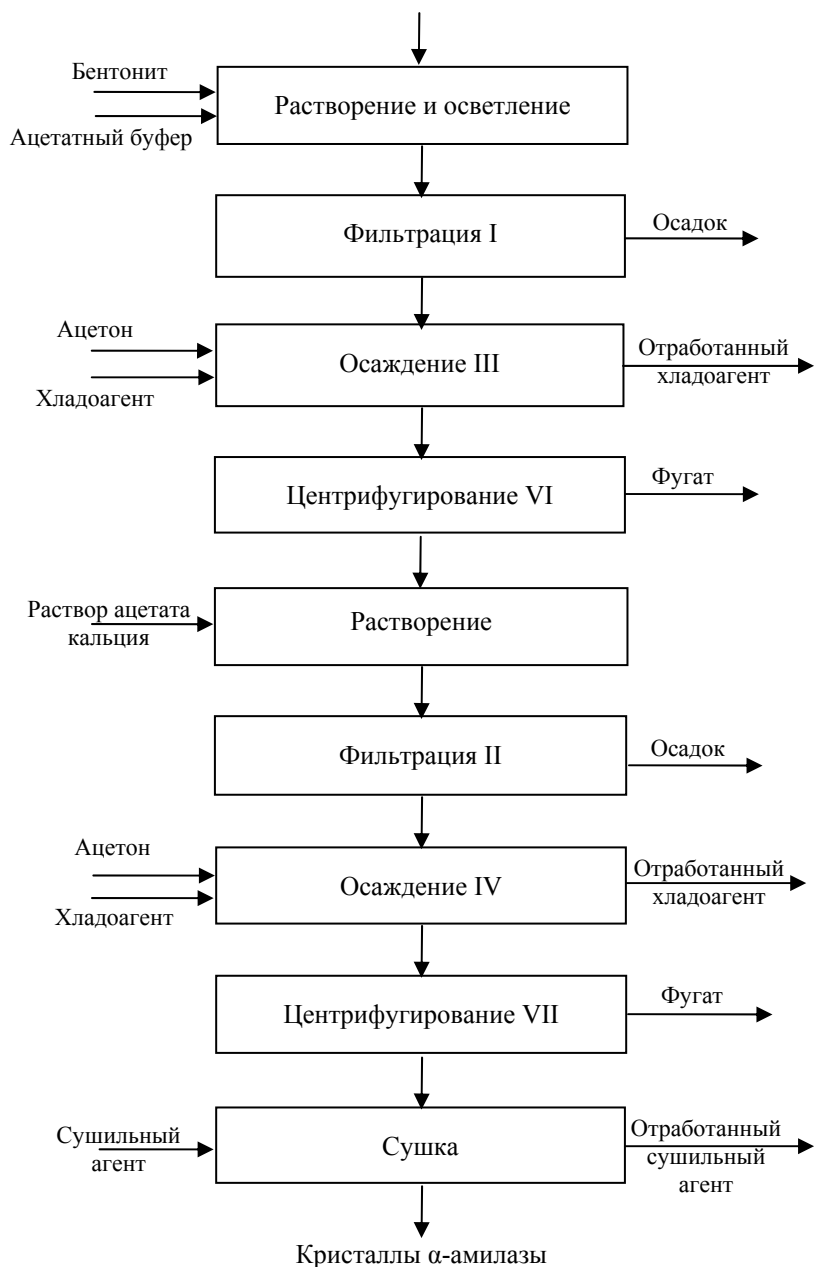
биоконверсии по сравнению с процессами химических превращений веществ состоит в том, что необходимые катализаторы синтезируются культурой микроорганизма и конверсия может быть осуществлена в одну технологическую стадию. Кроме того, ферментативные процессы в живых системах энергетически более выгодны, чем химический синтез.

Процессы биоконверсии могут осуществляться по различным технологическим схемам, в зависимости от состава сырья, его доступности действию ферментных систем микроорганизмов, заданной характеристики целевого продукта (рис. 2.5). В процессах биоконверсии используют необработанное растительное сырье ("прямая" биоконверсия), или сырье, подвергнутое предварительной обработке механическими, химическими, электрохимическими, радиационными методами, а также с помощью ферментных препаратов. Прямая биоконверсия целесообразна при переработке жидких субстратов с достаточно высоким содержанием легкоусвояемых соединений углерода и азота. При переработке твердых субстратов прямую биоконверсию применяют при наличии микроорганизмов с мощными ферментными системами, способными воздействовать на биополимеры сырья, прежде всего, на структурные полимеры.

Труднодоступное микробным ферментам сырье предварительно обрабатывают с целью повышения удельной поверхности, набухаемости, частичной или полной деструкции сложных биополимеров и их комплексов. Особое место занимает ферментативная обработка сырья, которая по сути является биоконверсионным процессом. Путем ферментативной обработки получают корма повышенной усвояемости, прежде всего, высокоэффективные углеводные корма, т.е. корма, содержащие большое количество легкоусвояемых сахаров.

Г15Х, Г20Х, П15Х, П20Х





**Рис. 2.4. Схема получения кристаллических ферментных препаратов**



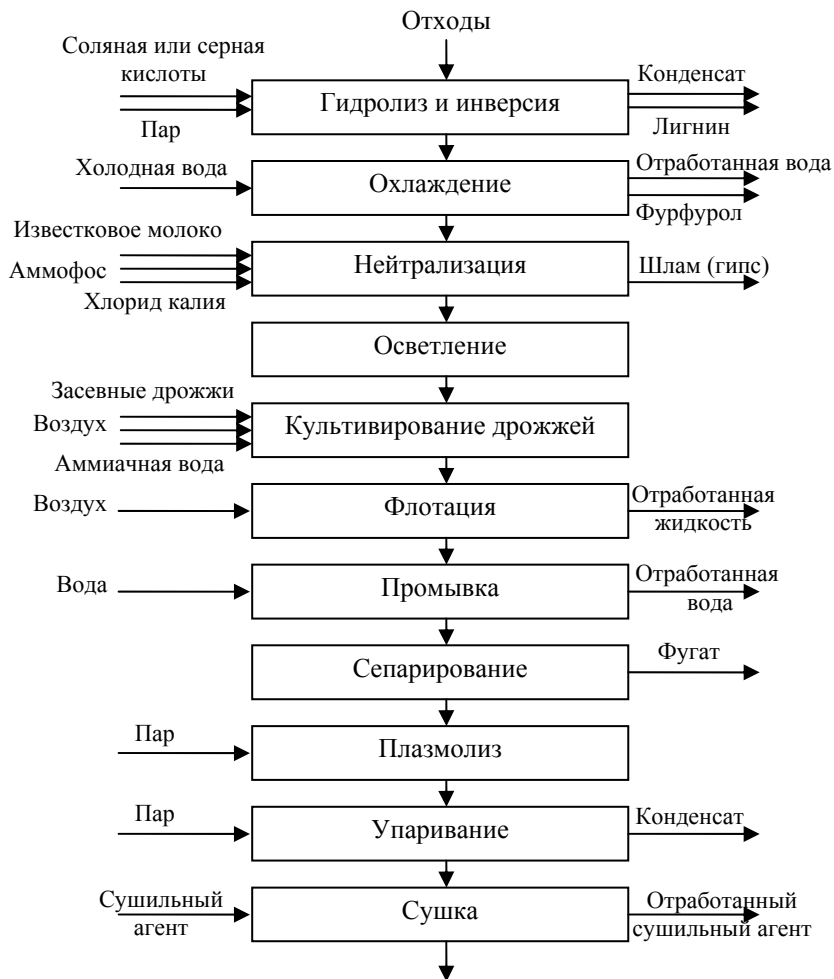
**Рис. 2.5. Общая схема получения белковых продуктов**

Корма, полученные путем микробиологической биоконверсии после ферментативной предобработки сырья, представляют собой продукты двойной биоконверсии. Микробиологическую биоконверсию растительного сырья осуществляют путем глубоинной, твердофазной или ферментации смешанного типа. Выбор способа культивирования зависит от вида сырья и физиологических особенностей микроорганизма, используемого при биоконверсии. Двухступенчатую ферментацию смешанного типа применяют при необходимости двухстадийной биоконверсии сырья различными штаммами микроорганизмов.

Среди продуктов биоконверсии растительного сырья можно выделить следующие группы: корма с повышенным содержанием легкоусвояемых веществ, протеинизированные корма (т.е. корма с повышенным содержанием белка), белковые пищевые продукты и обезвреженные корма.

Схема получения кормовых белковых продуктов из отходов переработки растительного сырья методом глубоинной ферментации представлена на рис. 2.6.

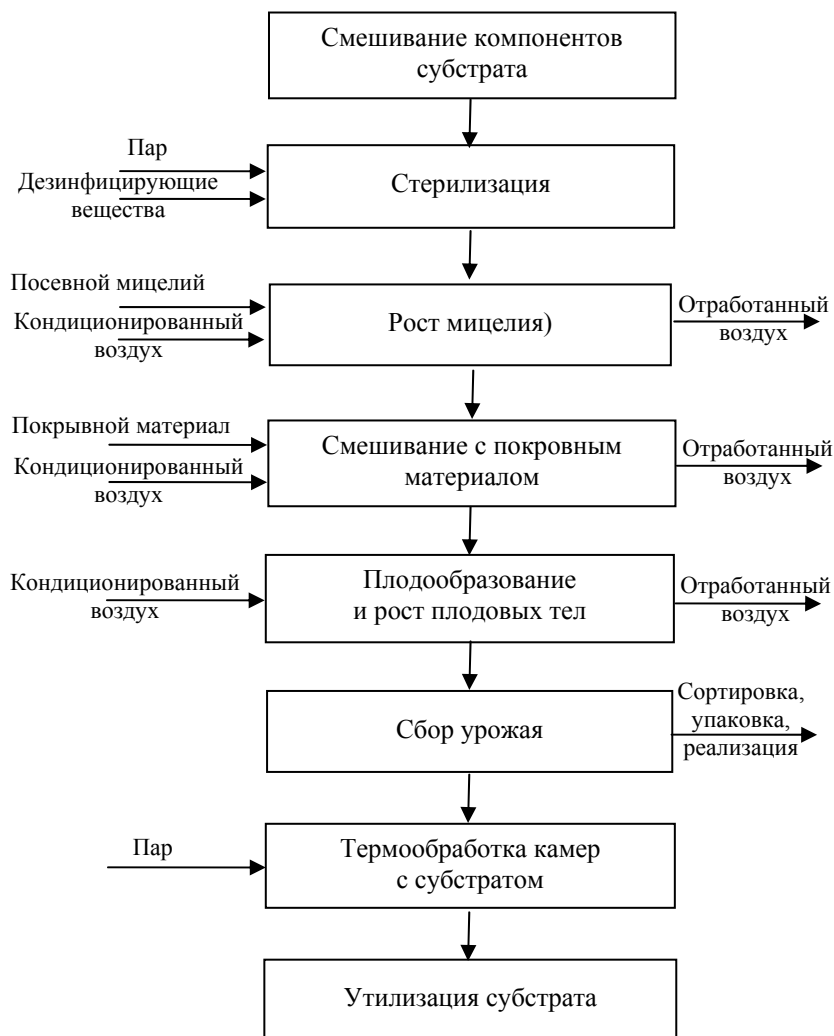




**Рис. 2.6. Схема получения кормовых дрожжей**

Мировой дефицит белка по данным из различных источников составляет 15...35 млн. т. При этом мировое производство пищевого белка за счет микробиологического синтеза, несмотря на многочисленные преимущества по сравнению с другими способами производства (использование дешевого сырья, высокая интенсивность синтеза белка, высокое содержание белка и незаменимых аминокислот в биомассе) составляет всего 20...25 тыс. т / год.

Схема получения пищевых белковых продуктов методом твердофазной ферментации представлена на рис. 2.7.

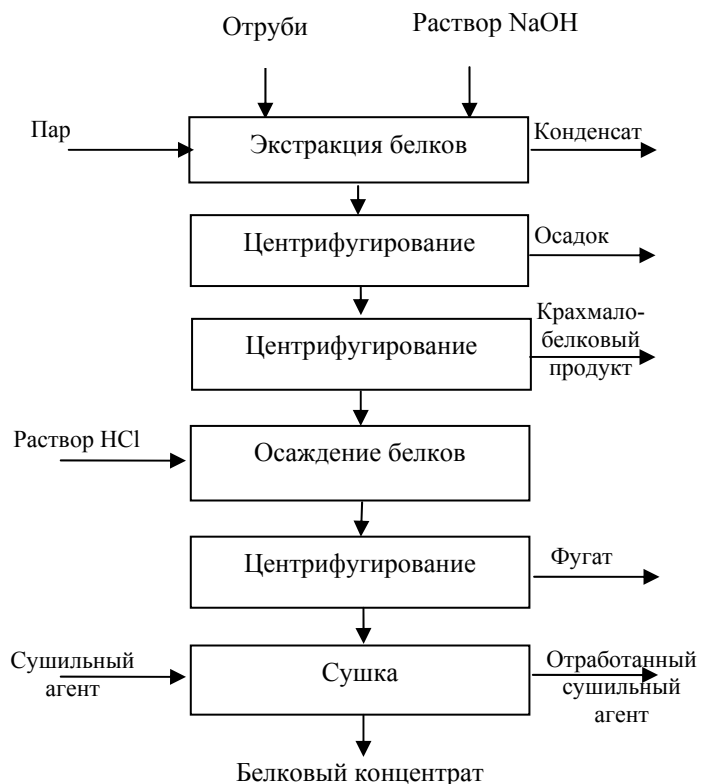


**Рис. 2.7. Схема производства шампиньонов**

Основным критерием ценности белковых продуктов биоконверсии является содержание истинного белка и сырого протеина. Вторым показателем всегда превышает первый, так как рассчитывается на основании содержания всех форм азота (сырой протеин = N-6,25). Соотношение истинного белка и сырого протеина в продуктах различно, так как определяется долей небелковых соединений в сумме азотсодержащих, которая зависит от многих факторов.

Существует шкала оценки качества пищевых и кормовых белковых продуктов на основании содержания белка. Пищевые белоксодержащие продукты делят на три группы: белковые изоляты (содержание сырого протеина не менее 85 %), белковые концентраты (не менее 65 % сырого протеина) и белковые продукты (не менее 30 % сырого протеина).

Белковые продукты из пшеничных отрубей получают методом щелочной или кислотной экстракции. По первому способу отруби обрабатывают 0,2 %-ным водным раствором гидроксида натрия при 50...60 °С и получают экстракт, от которого центрифугированием или прессованием отделяют нерастворимый остаток. Экстракт центрифугируют и получают крахмалобелковый продукт и осветленный экстракт. Из осветленного экстракта при подкислении соляной кислотой осаждают белок, который отделяют центрифугированием от сыворотки, промывают и сушат (рис. 2.8).



**Рис. 2.8. Схема производства белкового концентрата из отрубей**

Технология производства соевых белковых концентратов предусматривает три способа очистки белков от углеводов: кислая промывка соевой обезжиренной муки при pH 4,5; экстракция белкового лепестка 20...80 %-ным раствором этанола; денатурация белка посредством влаготепловой обработки с последующей экстракцией водой (рис. 2.9). Функциональные свойства таких белков при необходимости улучшают обработкой паром или гомогенизацией.



**Рис. 2.9. Схема производства соевых белковых концентратов**

Эскизная схема получения соевых белковых изолятов приведена на рис. 2.10.

Для получения белковых препаратов из биомассы дрожжей используют автолиз и ферментативный лизис с помощью дрожжелитических ферментных препаратов и протеаз обычного типа.

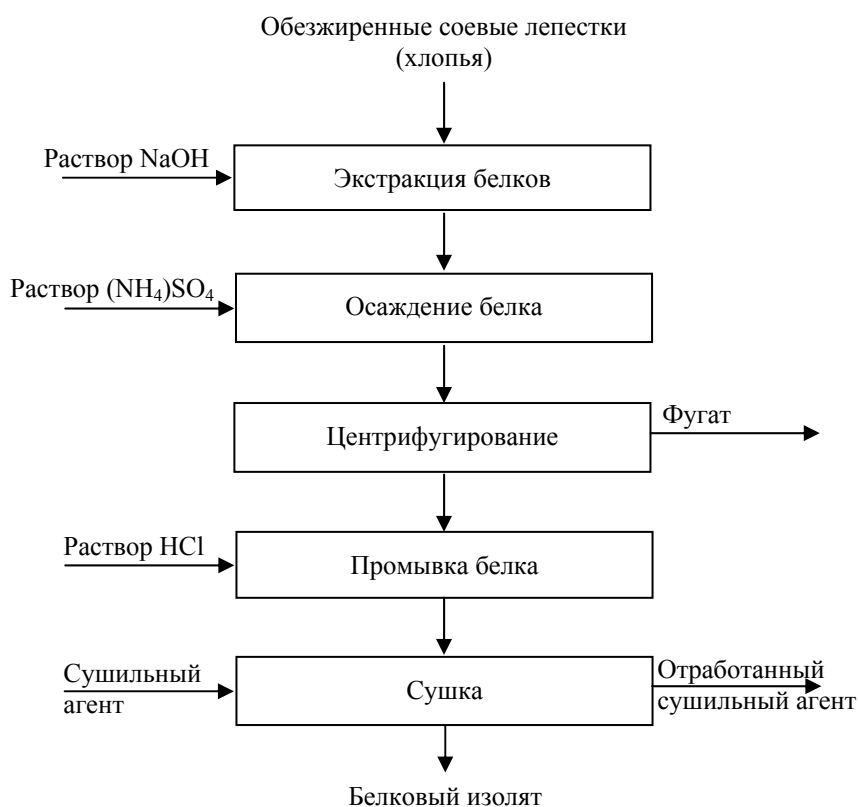
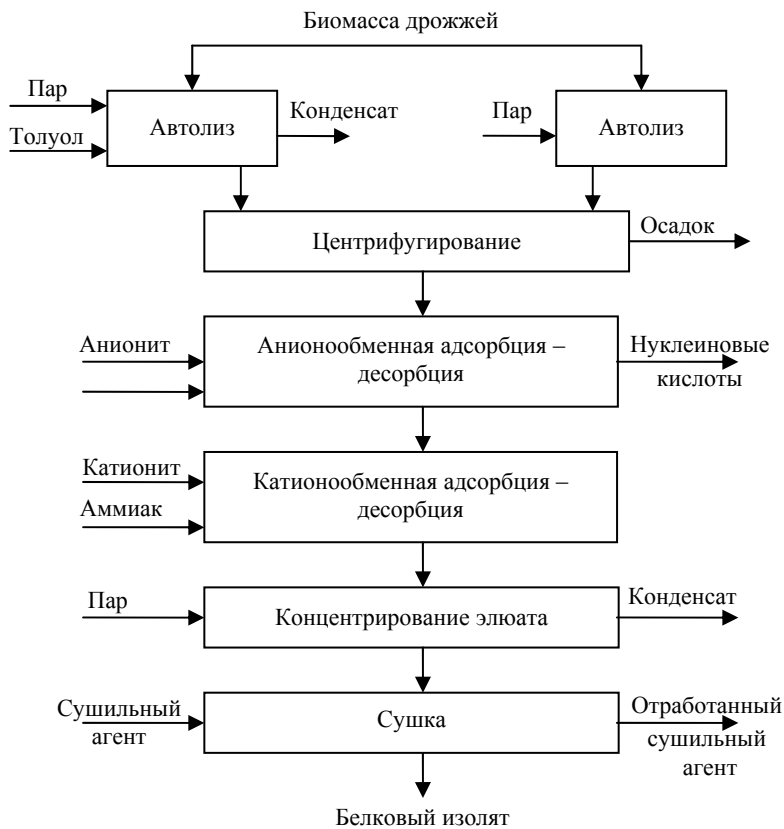


Рис. 2.10. Схема получения соевых белковых изолятов

Технологический автолиз дрожжей проводят в условиях подавления роста и активации цитоплазматических деполимераз. При блокировании роста автолиз клеточных стенок происходит слабо, и значительная часть стеночного материала может быть отделена в конце процесса в виде крупных структурных фрагментов. Активация цитоплазматических деполимераз приводит к накоплению продуктов гидролиза белков и нуклеиновых кислот. За счет этого в заключительной фазе автолиза происходит снижение pH реакционной среды. Регистрация pH является простым методом контроля автолиза: стабилизация pH свидетельствует об окончании процесса. Этот метод применим и при проведении лизиса дрожжей с помощью ферментных препаратов. Распространенным методом контроля является также определение содержания свободного аминного азота, нарастающего в процессе протеолиза.

Технологический автолиз пекарских дрожжей проводят при температуре 45...53 °С в присутствии плазмолизирующих агентов: толуола, хлороформа, этанола, поваренной соли и др. В суспензии биомассы создают pH 5,5...6,5. В ходе автолиза чаще всего pH не регулируют: при естественном изменении pH чередуются оптимальные условия для действия различных деполимеризующих ферментов, что повышает эффективность процесса в целом. Содержание сухих веществ в суспензии варьирует в пределах от 1 до 20 %, снижение концентрации биомассы в этих пределах приводит к интенсификации автолиза. Рациональной считают концентрацию около 10 %. Продолжительность автолиза составляет 15...30 ч, а при предварительной механической дезинтеграции замороженной биомассы – 5...6 ч.



**Рис. 2.11. Схема получения белковых изолятов из дрожжей**

Способ комплексной переработки биомассы пекарских дрожжей, разработанный отечественными учеными, предполагает проведение автолиза 20 % суспензии дрожжей в присутствии 1 % толуола, в течение 15...20 ч при 45...50 °С. Последующее фракционирование автолизата включает: отделение клеточных стенок дрожжей центрифугированием, обесцвечивание жидкой фазы автолизата, удаление нуклеиновых соединений и пептидов сорбцией на анионите, сорбцию аминокислот из очищенного раствора предыдущей стадии на катионите и их последующую элюцию раствором аммиака.

Получаемая смесь аминокислот содержит все незаменимые и заменимые аминокислоты в пропорциях, характерных для высокопитательных белковых продуктов. Содержание свободных аминокислот составляет около 70 % от белка автолизированной биомассы, около 25 % белка гидролизовано до низших пептидов.

По схеме (рис. 2.11) из 50 кг дрожжей с влажностью 75 % получают 2...3 кг смеси аминокислот, 0,3...0,5 кг нуклеиновых компонентов и около 6 кг клеточных стенок, из которых можно дополнительно выделить 0,035...0,045 кг эргостерина. Аминокислотная смесь используется для лечебного питания, а также в качестве добавок (2...3 %) в макаронные и мучные кулинарные изделия, что увеличивает их биологическую ценность на 20...40 %. Неочищенный дрожжевой автолизат, приготовленный с использованием нетоксичных плазмолитиков, может применяться как кормовая добавка в птицеводстве, рыбоводстве и звероводстве.

# ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ ПО ПОЛУЧЕНИЮ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ И БЕЛКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ

## Лабораторная работа 1

### ПОЛУЧЕНИЕ УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

Цель работы: изучение культивирования уксуснокислых бактерий и определение количества образовавшейся уксусной кислоты.

#### Теоретические предпосылки

Для получения пищевой уксусной кислоты используется способность уксуснокислых бактерий с помощью фермента алкогольоксидазы окислять этиловый спирт. Способностью превращать этиловый спирт в уксусную кислоту обладают различные виды уксуснокислых бактерий. Типичным представителем уксуснокислых бактерий является *Acetobacter aceti*. Это мелкие бесспорные палочки, часто соединенные в цепочки, развиваются только при доступе воздуха. При промышленном получении уксусной кислоты используют *Bacterium schützenbachii* и *Bacterium curvum*. Это грамотрицательные спорообразующие палочки, снабженные жгутиками, размером 0,4...0,8 мкм. Важным показателем является и предельная концентрация спирта в сбраживаемой среде. Для *Bacterium schützenbachii* она составляет 6...7 об. %, для *Bacterium curvum* – 9...14 об. %.

Для выращивания *Acetobacter aceti* в лабораторных условиях используется минеральная среда Лойцанской состава, г/л:  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  – 1,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,5;  $\text{MgSO}_4$  – 0,5. Источником углерода служит этиловый спирт, добавляемый ежедневно в количестве 0,2...0,5 % от объема среды. Среда разливается тонким слоем в конические колбы с ватными пробками. Для засева используется двух-, трехсуточная культура *Acetobacter aceti* на жидкой среде. Выращивание ведется при 30° в течение пяти-семи суток.

В конце опыта определяется количество образовавшейся уксусной кислоты.

В стационарной культуре *Acetobacter aceti* растет на поверхности среды, образуя тонкую нежную пленку, которая по мере роста опускается на дно в виде хлопьевидного осадка. При производственном культивировании в глубинных условиях необходимо бесперебойное аэрирование, кратковременные перерывы в подаче воздуха приводят к гибели культуры. При недостатке спирта в среде накопленная уксусная кислота переокисляется до конечных продуктов:  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ .

Промышленное производство уксусной кислоты включает следующие технологические стадии:

- 1) получение посевного материала;
- 2) подготовка питательной среды;
- 3) уксуснокислое брожение;
- 4) концентрация и розлив готового продукта.

Известны три способа производства уксусной кислоты.

Орлеанский (французский), или медленный способ. Окисление ведется в специальных чанах. Исходная питательная среда состоит из 2 %-ной уксусной кислоты и 4 %-ного сухого вина крепостью 9...12 %. Заражение уксуснокислыми бактериями происходит самопроизвольно из воздуха. Брожение ведут при температуре 30...20 °С, снижая температуру к концу брожения. В конце брожения получают уксус с содержанием 5...6 % кислоты. Уксус, полученный по Орлеанскому способу, обладает, так же как и вино, "букетом", придающим ему высокое качество.

Немецкий, или быстрый способ. Окисление спирта происходит в особых генераторах или чанах, заполненных буквыми стружками, на которых поселяются уксуснокислые бактерии. Большая поверхность стружек создает для бактерий хорошие условия аэрации. Перед началом процесса стружки пропитывают уксусной кислотой. Затем в них вносят затор (питательную среду), приготовленную из 6 %-ного уксуса и 3 %-ного этилового спирта. После окисления получают уксус, содержащий 9 %-ную уксусную кислоту. Затор, окисляясь, одновременно фильтруется через эти же буквые стружки. Ежедневно полученную уксусную кислоту делят на две неравные части: 2/3 его идут на приготовление нового затора и 1/3 – на расфасовку.

В промышленных условиях уксуснокислое брожение проводят непрерывным способом при глубинном проточном культивировании уксуснокислых бактерий в батарее последовательно соединенных аппаратов. Для этого способа наилучшим сырьем для уксуснокислых бактерий является этиловый спирт, полученный из зернокартофельного сырья. Выращивание бактерий ведут при температуре 28...37 °С при рН среды 3,0...3,2 при концентрации спирта 7...15 %. После накопления 8 %-ной уксусной кислоты развитие бактерий замедляется и при ее содержании в пределах 12...14 % рост бактерий полностью прекращается.

На жизнедеятельность уксуснокислых бактерий большое влияние оказывает реакция среды. Принято считать, что оптимальный рН для их развития находится в пределах 3...3,2, однако избыток уксусной кислоты в сбраживаемой среде угнетает жизнедеятельность бактерий-продуцентов. После накопления 8 % уксусной кислоты развитие бактерий замедляется и при содержании 12...14 % кислоты полностью прекращается. Для сохранения естественной чистоты бактериальной популяции оптимальной считается концентрация кислоты около 10 %. Важным показателем является и предельная концентрация спирта в сбраживаемой среде. Для *Bacterium schützenbachii* она составляет 6...7 об. %, для *Bacterium curvum* – 9...14 об. %. В промышленности уксуснокислое брожение проводят в батарее, состоящей из пяти последовательно соединенных ферментаторов.

Перед розливом уксусную кислоту осветляют, пропуская через слой бентонита, или бентонит добавляют в уксусную кислоту и туда же вносят немного лимонной кислоты, после перемешивания производят отделение уксусной кислоты, пропуская ее через фильтр-пресс. Из 100 л безводного спирта получают 75...90 кг уксусной кислоты. Из товарных форм уксусной кислоты известны: столовый уксус (6 и 9 %), чистая пищевая (70...80 %), чистая уксусная (70...80 %), безводная или

ледяная (98...99,8 %). Для получения уксусной эссенции или ледяной уксусной кислоты уксусную кислоту концентрируют с помощью ректификации,

Кроме перечисленных товарных форм в кулинарии широко используют фруктовый уксус. Фруктовый уксус отличается от обычного уникальностью лечебных свойств и удивительным набором компонентов, так как в него практически без потерь переходят все полезные вещества фруктов (макро- и микроэлементы, витамины, ферменты, аминокислоты, уксусная, пропионовая, молочная, лимонная и другие кислоты). В технологию получения фруктового уксуса входят стадии измельчения сырья, приготовления сула, спиртового брожения, фильтрации (процеживания) бражки, уксуснокислого брожения. Оптимальной для роста уксуснокислых бактерий считается температура 26...28 °С. Через два-три месяца жизнедеятельности уксуснокислых бактерий винный спирт превращается в уксус, который отличается натуральной мутностью и ароматом фруктов.

#### Порядок выполнения работы

#### В а р и а н т 1. ПОЛУЧЕНИЕ УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ НА СИНТЕТИЧЕСКОЙ СРЕДЕ ЛОЙЦЯНСКОЙ

1. В колбы вместимостью 500 мл внести 50 мл указанной среды.
2. Определите рН среды при помощи рН-метра. Для этого прибор через адаптер подключите к сети переменного тока 220 В. Electroды (сравнения, вспомогательный и термокомпенсации) промыть дистиллированной водой, осушить и погрузить в исследуемую жидкость. Уровень погружения электрода в жидкость, для бесперебойной работы рН-метра, должен быть выше 16 мм. Включить прибор нажатием кнопки On/Off, а кнопкой mV/pH выбрать режим измерения рН. Через 30...60 с снять показания и выключить прибор кнопкой On/Off.
3. Колбы со средами, закрыв ватной пробкой и бумажным колпачком, простерилизовать в автоклаве в течение 30 мин при температуре 121 °С.
4. В охлажденную стерильную среду внести 0,5 мл посевного материала. В среду Лойцянской добавить 2-3 капли 96 % этилового спирта.
5. Колбы поместить в термостат при 30 °С. В среду Лойцянской ежедневно вносить 2-3 капли 96 % этилового спирта.
6. Первую колбу извлечь из термостата через семь дней.
7. По окончании выращивания *Acetobacter acetii* описать культуральные признаки (наличие пленки, ее вид, осадок, запах и т.д.) и микроскопическую картину (форму, размер бактерий).
8. Отделить накопившуюся биомассу фильтрованием через складчатый фильтр.
9. Определить рН фильтрата при помощи рН-метра.
10. Провести качественную реакцию на уксусную кислоту. Для этого 10 мл фильтрата перенести пипеткой в стакан на 100 мл, добавить одну – две капли фенолфталеина и нейтрализовать 10 %-ным раствором соды (до появления устойчивой бледно-розовой окраски). Если в фильтрате присутствует уксусная кислота, то при добавлении раствора хлорида железа (III), раствор приобретет красно-бурое окрашивание вследствие образования ацетата железа (III).
11. Определить количество образовавшейся уксусной кислоты в процентах. Для этого 10 мл фильтрата перенести пипеткой в стакан на 100 мл, добавить 10 мл воды и 2-3 капли фенолфталеина, титровать 0,1 н раствором NaOH до слабозеленой не исчезающей окраски. Количество образовавшейся уксусной кислоты в процентах вычислить по формуле (1.1):

$$x = \frac{0,006aK}{b} 100\%, \quad (1.1)$$

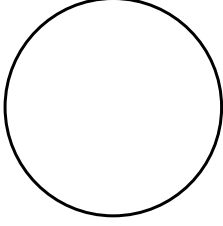
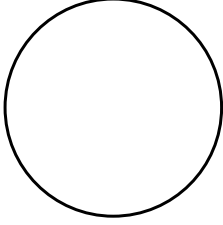
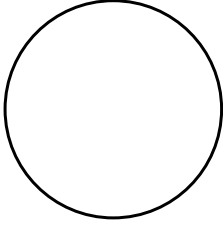
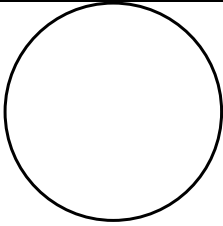
где а – число миллилитров 0,1 н раствора NaOH, пошедшего на титрование; б – число миллилитров культуральной жидкости, взятой для титрования; К – поправка щелочи; 0,006 – количество граммов уксусной кислоты, соответствующее 1 мл 0,1 н раствора NaOH.

12. Последующие колбы извлечь из термостата через 14 (21, 28) дней и повторить пп. 7 – 11.
13. Все полученные результаты свести в табл. 1.1.
14. Построить графики зависимости накопления уксусной кислоты и уровня рН от длительности культивирования.

#### В а р и а н т 2. ПОЛУЧЕНИЕ ФРУКТОВОГО УКСУСА ИЗ СУХОГО ВИНА

1. Приготовить сухое вино с концентрацией спирта 6...7 % об. Для этого с помощью спиртометра определить содержание алкоголя и довести его количество до требуемого путем добавления кипяченой водопроводной воды.
2. В колбы вместимостью 500 мл цилиндром налить 100 мл подготовленного сухого вина, внести пипеткой 1 мл посевного материала и закрыть ватной пробкой.
3. Колбы поместить в термостат при 30 °С. Далее выполнять работу согласно пунктам 6 – 13 варианта 1.

### 1.1. Экспериментальные данные

Время культивирования, сут.	Культуральные признаки	Морфологические признаки	Уровень рН	Количество уксусной кислоты, %
0				
7				
		X		
14				
		X		
21				
		X		
28				
		X		

#### Контрольные вопросы

1. Почему органические кислоты, полученные микробиологическим синтезом, предпочтительнее использовать в пищевой промышленности, чем кислоты, полученные органическим синтезом?
2. Какие микроорганизмы являются продуцентами уксусной кислоты?
3. Приведите уравнение процесса образования уксусной кислоты.
4. Перечислите товарные формы уксусной кислоты. Чем отличаются технологии получения различных товарных форм?
5. Как производится выращивание *Acetobacter aceti* в лабораторных условиях на синтетической среде Лойцянской и на основе сухого вина?
6. Перечислите культуральные и морфологические признаки *Acetobacter aceti*.
7. Какие факторы влияют на процесс культивирования уксуснокислых бактерий и количество образовавшейся уксусной кислоты?
8. Какой способ используют для промышленного получения уксусной кислоты и чем он отличается от используемых ранее способов?



## Лабораторная работа 2

### ПОЛУЧЕНИЕ БЕЗАЛКОГОЛЬНОГО НАПИТКА ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ КОМПЛЕКСА МИКРООРГАНИЗМОВ ЧАЙНОГО ГРИБА

Цель работы: ознакомиться с симбиозом микроорганизмов в природе и использованием этого явления в практических целях.

#### Теоретические предпосылки

В природе широко распространен симбиоз микроорганизмов, и это можно наблюдать в чайном грибе, в котором совместно развиваются дрожжи (дрожжевые грибки) и уксуснокислые бактерии. Таким образом, чайный гриб – это культура двух одновременно живущих микроорганизмов, образующих толстую слизистую пленку на поверхности подсахаренного чайного настоя. В результате их жизнедеятельности и образуется чайный квас, приобретающий слегка газированный кисло-сладкий вкус. В банке готового чайного настоя можно видеть, что на поверхности прозрачно-буроватой жидкости "плавает" толстый диск: сверху белый, плотный и блестящий, снизу – сероватый и рыхлый. Научное название чайного гриба – медузомицет – обусловлено сходством с медузой.

Тело чайного гриба представляет собой колонию дрожжей и уксуснокислых бактерий. Дрожжи, занимающие нижнюю часть слоевища гриба, перерабатывают содержащиеся в растворе сахар на спирт и углекислый газ (диоксид углерода), тем самым подготавливая питательную среду для уксуснокислых бактерий, которые склеены между собой особым веществом и образуют верхнюю, плотную часть гриба. Состав уксуснокислых бактерий неодинаков, а поэтому и вырабатываемые ими вещества неоднородны. Одни из них окисляют образованный дрожжами этиловый спирт в уксусную кислоту, другие превращают сахарозу в глюкозу и фруктозу и окисляют моносахара до глюконовых кислот. Образовавшиеся кислоты используются дрожжами для синтеза витаминов, необходимых для развития уксуснокислых бактерий.

Предполагают, что колонии дрожжевых грибков и уксуснокислых бактерий произошли от микроорганизмов, населяющих почвы Приморского края, которые с мельчайшими частицами земли, прилипшими к корням женьшеня или копытня, попадали в настой и, очутившись в благоприятных условиях, бурно размножились, образуя колонию в виде пленки на поверхности жидкости. Вероятно, так и возникла культура чайного гриба, которая затем распространилась чуть ли не по всему земному шару.

Во многих аптеках Европы настой чайного гриба продается и пользуется большой популярностью. Концентрированный чайный гриб, запатентованный в Германии под названием "Комбука", сохраняет все необходимые активные вещества чайного гриба, за исключением уксусной кислоты и спирта. Установлено, что в состав напитка чайного гриба входят вещества, жизненно необходимые для организма человека: витамины С, группы В, Р и D; органические кислоты (уксусная, глюконовая, щавелевая, молочная, лимонная); ферменты (каталаза, амилаза, протеаза, липаза). Кроме того, в нем присутствуют антибиотики, подавляющие развитие стафилококков, стрептококков и других бактерий. Наиболее благотворное влияние на организм оказывает глюконовая кислота, обладающая дезинтоксикационным действием. Молочная кислота уничтожает вредную микрофлору кишечника и нормализует его функции. Чайный гриб эффективен при атеросклерозе, хорошо снимает повышенное артериальное давление, способствует уменьшению и даже прекращению головной боли, нормализует сон. Таким образом, постоянное употребление настоя чайного гриба улучшает самочувствие и даже излечивает от некоторых болезней.

Для получения наиболее качественного напитка следует брать только кипяченую воду, так как вода из-под крана содержит много кальция, который в кипяченой воде выпадает в осадок. Кальций в некипяченой воде соединяется с глюконовой кислотой, образуя на дне сосуда осадок глюконата кальция.

#### Порядок выполнения работы

Лабораторная работа проводится на двух занятиях. На первом занятии готовят среду для развития чайного гриба и его посев. На втором проводят анализ готового напитка.

##### З а н я т и е 1

Для того чтобы получить качественный "чайный гриб", необходимо тщательно соблюдать чистоту на стадии его приготовления. Для создания оптимальных условий рекомендуется концентрация сахара в напитке 10%, температура окружающей среды 25...30 °С, продолжительность настаивания – одна-две недели.

Обязательный компонент жидкости, в которой развивается гриб, – настой чая, который служит источником азотистых веществ для дрожжей и уксуснокислых бактерий и сахарозы – источник углерода.

1. Вскипятить 1 л воды, добавить в воду одну чайную ложку (или один пакетик) чая.
2. Через 15...20 мин, когда раствор настоится, добавить в него 100 г сахарозы (сахарного песка), тщательно перемешать, охладить до температуры 25...30 °С.
3. Подготовленный раствор отфильтровать через капроновое или металлическое ситечко непосредственно в подготовленную банку (объемом 2–3 литра).
4. Внести в подготовленный чайный раствор слой чайного гриба, отделенного от уже растущего и используемого в качестве маточной культуры чайного гриба. Культивирование проводить при комнатной температуре (20...25 °С), накрыв банку с грибом салфеткой.

Полученный напиток может быть использован для определения в нем некоторых продуктов метаболизма. В банку по мере необходимости заливают раствор чая и сахарный песок для получения новой порции чайного напитка.

Разросшийся чайный гриб в дальнейшем можно разрезать на мелкие кусочки, как по горизонтали, так и по вертикали и засеивать новые емкости с подготовленным чайно-сахарным раствором.

## З а н я т и е 2

Для оценки качества напитка определяют количество накопившихся кислот.

1. Определить уровень pH (см. лабораторную работу 1). Обычно pH настоя имеет кислую реакцию в зоне pH от 5 до 3.
2. Определить массовую долю молочной кислоты титрометрическим методом.

Метод основан на нейтрализации молочной кислоты гидроокисью натрия (омыление ангидридов лактиломочных кислот щелочью) при нагревании и нейтрализации избытка щелочи серной кислотой.

В коническую колбу со шлифом объемом 250 мл внести 10 мл настойки чайного гриба, 80 мл дистиллированной воды и 20 мл раствора 1 н NaOH, перемешать и кипятить с обратным холодильником в течение 5 мин.

Затем охладить, предварительно закрыв колбу пробкой с трубкой, наполненной натронной известью, добавить 3 капли раствора фенолфталеина и титровать раствором 1 н H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> до обесцвечивания.

Параллельно провести контрольный опыт. В коническую колбу со шлифом объемом 250 мл внести 20 мл 1 н NaOH, 90 мл дистиллированной воды; кипятить с обратным холодильником в течение 5 мин; охладить, закрыв ее пробкой с трубкой, наполненной натронной известью; добавить 3 капли раствора фенолфталеина и титровать 1 н H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> до обесцвечивания.

3. Массовую долю молочной кислоты X, % вычислить по формуле (2.1):

$$X = \frac{(V_{\text{оп}} - V_{\text{к}})K \cdot 0,09}{100}, \quad (2.1)$$

где V<sub>оп</sub> – объем 1 н H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, израсходованной на титрование избытка 1 н NaOH опытной пробы, мл; V<sub>к</sub> – объем 1 н H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, израсходованной на титрование избытка 1 н NaOH контрольной пробы, мл; K – поправочный коэффициент для раствора 1 н NaOH; 0,09 – масса молочной кислоты, соответствующая 1 см<sup>3</sup> 1 н NaOH, г/см<sup>3</sup>; V – объем раствора чайного гриба, взятого на анализ, мл; 100 – коэффициент пересчета на 100 мл раствора чайного гриба.

4. Определить массовую концентрацию уксусной кислоты (титруемую кислотность) по количеству гидроокиси натрия, израсходованной на титрование уксусной кислоты, содержащейся в растворе чайного гриба.

В стакан пипеткой внести 5 мл раствора чайного гриба, добавить 10 мл дистиллированной воды и две-три капли раствора фенолфталеина и титровать раствором 0,1 н NaOH до появления не исчезающего в течение 30 с розового окрашивания.

5. Массовую концентрацию уксусной кислоты (титруемую кислотность P) в г/100 мл вычислить по формуле

$$P = \frac{0,06 \cdot 100 V_1}{V_2}, \quad (2.2)$$

где 0,06 – количество уксусной кислоты в г, соответствующее 1 мл раствора 0,1 н NaOH; V<sub>1</sub> – количество раствора 0,1 н NaOH, пошедшего на титрование; V<sub>2</sub> – количество раствора чайного гриба, взятого на титрование, мл.

За окончательный результат принять среднеарифметическое P двух параллельных определений P<sub>1</sub> и P<sub>2</sub>.

6. В виде табл. 2.1 записать, как в процессе культивирования менялись физико-химические и органолептические показатели настоя чайного гриба.

**2.1. Результаты анализа физико-химических и органолептических показателей настоя чайного гриба**

Время культивирования, сут.	Показатели			Органолептическая оценка
	уровень pH	количество молочной кислоты, %	количество уксусной кислоты, %	
5				
7				
10				
14				

7. Сделать заключение по лабораторной работе о продолжительности культивирования чайного гриба для получения качественного слегка газированного напитка.

### Контрольные вопросы

1. Симбиоз каких микроорганизмов представляет собой биомасса чайного гриба?
2. Чем вызвано научное название чайного гриба – медузомицет?
3. В чем проявляются симбиотические отношения комплекса микроорганизмов чайного гриба?
4. Какие компоненты напитка на основе чайного гриба делают его полезным для здоровья?

5. Почему для выращивания чайного гриба следует брать кипяченую воду?
6. Какие компоненты питательной среды служат источниками углерода и азота в процессе культивирования чайного гриба?
7. Какие условия необходимо поддерживать в процессе культивирования биомассы чайного гриба?
8. Чем отличаются методики определения уксусной и молочной кислот в культуральной жидкости?
9. При какой продолжительности культивирования чайного гриба достигаются оптимальные органолептические показатели?
10. Как взаимосвязаны физико-химические и органолептические показатели настоя чайного гриба?

### Лабораторная работа 3

#### ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ БИОСИНТЕЗА ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ ПРИ ПОВЕРХНОСТНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ

Цель работы: изучить влияние состава питательной среды на биосинтез лимонной кислоты при культивировании микроскопических грибов *Aspergillus niger*.

#### Теоретические предпосылки

Лимонная кислота  $\text{CH}_2\text{COOH}-\text{COHCOOH}-\text{CH}_2\text{COOH}$  является трехосновой оксикислотой, кристаллизующейся из водных растворов с одной молекулой воды в виде бесцветных прозрачных кристаллов. Производство лимонной кислоты основано на культивировании микроскопических грибов *Aspergillus niger*, которые сбраживают сахара питательной среды, образуя лимонную кислоту. В качестве углеродсодержащего компонента питательной среды используют мелассу, содержащую 45...48 % сахарозы. Кроме того, в состав питательной среды входят нитрат аммония, моно- или дифосфат калия, сульфат магния, цинка, железа.

Культивирование продуцента проводят поверхностным или глубинным способом. Производство лимонной кислоты включает следующие основные технологические стадии: получение посевного материала, подготовку мелассы к сбраживанию, сбраживание растворов мелассы в лимонную кислоту с последующим отделением мицелия, выделение из сброженных растворов лимонной кислоты и получение ее в кристаллическом виде.

В лабораторной работе изучается влияние концентрации мелассы в питательной среде на процесс накопления лимонной кислоты микроскопическими грибами. Биохимическая активность культуры *Aspergillus niger* оценивается гравиметрическим (по массе мицелиальной пленки), титриметрическим (по объему щелочи, пошедшей на титрование культуральной жидкости) и потенциометрическим (по изменению кислотности среды в процессе культивирования) методами.

Для оценки биохимической активности используют следующие показатели:

- 1) содержание лимонной кислоты в 1 мл культуральной жидкости

$$x = \frac{0,007a}{b}, \quad (3.1)$$

где  $a$  – число мл 0,1 н раствора NaOH, пошедшего на титрование;  $b$  – число мл культуральной жидкости, взятой на титрование; 0,007 – количество грамм лимонной кислоты, соответствующее 1 мл 0,1 н раствора NaOH;

- 2) выход лимонной кислоты в процентах от исходного сахара

$$y = \frac{xV_{\text{кж}}}{c} 100 \%, \quad (3.2)$$

где  $V_{\text{кж}}$  – объем культуральной жидкости, мл;  $c$  – содержание сахара в исходной питательной среде, г;

- 3) продуцирующая способность культуры

$$\Pi = \frac{xV_{\text{кж}}}{m}, \quad (3.3)$$

где  $m$  – масса мицелиальной пленки, г;

- 4) pH исходной питательной среды и культуральной жидкости.

Лабораторная работа проводится на двух занятиях: на первом – готовят питательную среду, измеряют ее кислотность, стерилизуют и засевают культурой гриба *Aspergillus niger*; на втором – анализируют биохимическую активность продуцента, определяя pH культуральной жидкости, массу мицелиальной пленки и объем пошедшего на титрование лимонной кислоты раствора едкого натра.

#### Порядок выполнения работы

1. Приготовить 100 мл жидкой питательной среды в конической колбе из компонентов по одному из вариантов, указанных в табл. 3.1.

### 3.1. Состав питательной среды

Компоненты питательной среды	Варианты				
	1	2	3	4	5
Меласса, г (содержание сахарозы 46 %)	60	50	40	30	20
Раствор солей, мл, концентрацией, мг/мл: $\text{NH}_4\text{NO}_3 - 2,3$ ; $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0,2$ ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 1,0$ ; $\text{ZnSO}_4 - 0,02$ ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,06$	10				
Вода водопроводная, мл	60	65	70	75	80

Взвесить на технических весах пустой стаканчик, поместить в него необходимое количество мелассы, навеску перенести в коническую колбу, смывая остатки мелассы со стенок и дна стаканчика указанным в таблице количеством воды, затем добавить в колбу мерным цилиндром 10 мл раствора солей.

2. Измерить кислотность питательной среды рН-метром. Для этого включить прибор в сеть; промыть электроды дистиллированной водой, просушить фильтровальной бумагой и опустить в стаканчик с питательной средой; установить переключатель вида компенсации (КТ-Р) в положение "КТ"; переключатель вида измерения (рН, °С, mV) установить в положение "рН"; после установления показаний считать результат измерения.

3. Перелить питательную среду из стаканчика рН-метра в коническую колбу; закрыть колбу ватной пробкой и бумажным колпачком, подписать и стерилизовать 15 мин при 1 атм. в автоклаве.

4. Внести в остывшую до температуры 30 °С питательную среду посевной материал. Для этого в пробирку с культурой *Aspergillus niger* на сусло-агаре залить стерильную воду до верхнего края косяка. Проводя бактериологической петлей по поверхности косяка, перенести в воду часть темного конидиального слоя. Полученную водную суспензию конидий перемешать, отобрать стерильной пипеткой 0,5 мл и вылить в колбу со стерильной средой. Поместить колбу в термостат с температурой 30 °С на семь суток.

5. Изучить биохимическую активность культуры. Для этого отделить мицелий от культуральной жидкости фильтрованием и определить массу мицеллиальной пленки взвешиванием на технических весах. Измерить объем культуральной жидкости мерным цилиндром, измерить рН культуральной жидкости рН-метром. Определить содержание лимонной кислоты в культуральной жидкости путем титрования щелочью: поместить пипеткой 2 мл фильтрата в коническую колбу; добавить мерным цилиндром 200 мл дистиллированной воды, 3-4 капли фенолфталеина и титровать из бюретки 0,1 н NaOH до слабозимной окраски.

6. Рассчитать содержание лимонной кислоты в 1 мл культуральной жидкости по формуле (3.1), выход лимонной кислоты в процентах от исходного сахара по формуле (3.2) и продуцирующую способность культуры по формуле (3.3). Построить графические зависимости этих показателей от концентрации сахарозы в питательной среде.

7. Результаты измерений и расчетов свести в табл. 3.2.

### 3.2. Экспериментальные и расчетные показатели

Биохимические показатели	Варианты				
	1	2	3	4	5
Количество сахара в питательной среде, г/л					
рН питательной среды					
рН культуральной жидкости					
Объем культуральной жидкости, мл					
Объем 0,1 н NaOH на титрование, мл					
Масса мицеллиальной пленки, г					
Содержание лимонной кислоты в 1 мл культуральной жидкости, г/мл					
Выход лимонной кислоты от исходного сахара, %					
Продуцирующая способность, г/г					

## Контрольные вопросы

1. Назовите органические кислоты, которые получают микробиологическим синтезом.
2. Какие микроорганизмы являются продуцентами лимонной кислоты?
3. Какие вещества, входящие в состав питательной среды, являются источниками углерода, азота, фосфора, макро- и микроэлементов?
4. Напишите суммарное уравнение процесса образования лимонной кислоты.
5. Какие методы изучения биохимической активности культуры применяются в этой работе?
6. Назовите основные технологические стадии производства лимонной кислоты.
7. Как рассчитать выход лимонной кислоты?
8. Что такое продуцирующая способность культуры?
9. Как будет отличаться величина продуцирующей способности пленок гриба *Aspergillus niger* одинаковой массы, используемых для биосинтеза лимонной кислоты, если на титрование одной культуральной жидкости пошло 10 мл 0,1 н раствора NaOH, а другой – 2,5 мл?
10. Какие методы используют для выделения лимонной кислоты из культуральной жидкости?

## Лабораторная работа 4

### ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА НАКОПЛЕНИЕ АМИЛАЗЫ ПРИ ТВЕРДОФАЗНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ МИКОМИЦЕТА

Цель работы: изучение влияния состава и влажности питательной среды на накопление амилазных ферментов при твердофазном культивировании микроскопического гриба *Aspergillus oryzae*.

#### Теоретические предпосылки

К твердофазной ферментации, культивированию принято относить выращивание микроорганизмов на твердом, полутвердом субстрате или твердом носителе, инертном к питательным веществам, применение которого облегчает микроорганизмам доступ к последним. Такой тип культивирования также называют поверхностным.

В биотехнологических производствах твердофазное культивирование применяется при биокомпостировании, при получении микотоксинов, органических кислот, ферментных препаратов, приготовлении различных блюд из зерновых, корнеплодов и плодов. Например, в Турции путем ферментации получают из смеси муки, йогурта и овощей блюдо "тархана", в Индии путем молочного сбраживания риса, фасоли или бобов – продукт "дозай". В результате плесневой и дрожжевой ферментации смеси муки из кукурузы, сорго и проса готовят блюда в Африке, Южной Америке. В странах Азии, Японии на основе соевых бобов с помощью поверхностного культивирования гриба *Aspergillus oryzae* вырабатывают соусы. Способ приготовления сыров типа "Рокфор" также является разновидностью твердофазного культивирования гриба рода *Penicillium*.

Большое влияние уделяется разработке технологий твердофазной ферментации зерна и сельскохозяйственных отходов с целью обогащения их белками и превращение в высокопитательные кормовые продукты. Изучены возможности интенсификации твердофазной ферментации при силосовании.

Твердофазное культивирование микроскопических грибов было одним из первых способов промышленного получения ферментных препаратов. Технология твердофазного культивирования продуцентов ферментов подразделяется на стадии получения посевного материала, производственной культуры, ферментного препарата. Посевным материалом служит поверхностно выращенная до обильного спорообразования культура гриба или глубинно выращенный мицелий. На процесс накопления эндоферментов мицелиальными грибами при их твердофазном культивировании оказывают влияние следующие технологические условия – состав и структура питательной среды, ее влажность, температура в слое, относительная влажность и температура воздушной среды в растительной камере, длительность развития культуры, вид посевного материала.

Твердофазное культивирование микроорганизмов в производстве ведут на сыпучих питательных средах на основе пшеничных отрубей, свекловичного жома, солодовых ростков и т.п. при высоте слоя 25 мм и более.

Подготовка питательной среды состоит в дозировании компонентов, их увлажнении до  $W = 35...40\%$ , стерилизации острым паром при 120 °С в течение одного часа, до увлажнения  $W = 55...58\%$ , охлаждении до 40 °С и внесении посевного материала из расчета  $7,5 \cdot 10^8$  конидий на 1 кг сухой среды. Эти операции проводят в специальном стерилизаторе. После внесения посевного материала среду перемешивают в течение 40 мин. Засеянная питательная среда влажностью 58...60 % раскладывается на перфорированные кюветы слоем 30 мм и более, которые размещаются на стеллажах растительной камеры.

В процессе выращивания регулируют температуру, влажность среды и расход стерильного воздуха. Внешний теплообмен микроорганизмов при твердофазном культивировании создается в режиме конвективного движения стерильного воздуха через слой среды методом объемной аэрации. Воздух выполняет роль теплоагента, изменяет концентрацию углекислого газа в порах среды и камере, снабжает растущую культуру кислородом. Расход воздуха увеличивается пропорционально скорости выделения тепла биомассой и составляет 1...25 л/ч на 1 кг среды, относительная влажность воздуха – 98...99 %.

В период активного роста мицелий гриба пронизывает весь слой материала, оплетая частицы среды, поэтому в конце культивирования питательная среда имеет вид плотного коржа и называется поверхностной культурой. Она содержит 65...78 % нерастворимых веществ.

Ферменты, находящиеся во внутриклеточном пространстве, из-за небольшого диффузионного сопротивления клеточной стенки мицелия легко извлекаются из культуры продуцента методом водной экстракции. При экстракции из поверхностной культуры одновременно с ферментами извлекаются и другие растворимые вещества, такие, как аминокислоты, низкомолекулярные углеводы, соли, кислоты и т.д., которые можно удалить в процессе осаждения

органическими растворителями или высаливанием. Если принять содержание сухих веществ в культуре гриба за 100 %, то при экстракции 22...23 % их переходят в раствор, на долю ферментов приходится 3...5 %.

В лабораторной работе предлагается исследовать влияние состава и влажности питательной среды на уровень накопления амилолитического фермента в процессе выращивания культуры микроскопического гриба *Aspergillus oryzae* на твердой сыпучей среде, состоящей из пшеничных отрубей и древесных опилок.

Амилаза катализирует реакцию гидролиза крахмала и относится к ферментам группы гидролаз. Расщепление крахмала происходит по кислородным мостикам, соединяющим молекулы глюкозы. Под действием  $\alpha$ -амилазы из крахмала образуется дисахарид мальтоза, состоящий из двух остатков глюкозы, поэтому процесс этот называется осахариванием крахмала. И он лежит в основе приготовления суслу из зерна и картофеля в спиртовом производстве, приготовлении затора в пивоварении.

В качестве промежуточных продуктов при гидролизе крахмала образуются соединения разного молекулярного веса, называемые декстринами. На первых стадиях гидролиза получаются декстрины с высокой степенью полимеризации (35...40), с йодом они дают синее окрашивание, как и крахмал. По мере дальнейшего гидролиза молекулярный вес декстринов снижается и от йода они начинают окрашиваться в фиолетовый, затем темно-бурый, красноватый цвет и, наконец, перестает реагировать с йодом. Это свойство положено в основу определения количества фермента амилазы в культуре гриба или ферментном препарате. Выделить фермент в чистом виде и определить его количество – очень сложная задача. Удобнее определить количество фермента по активности его воздействия на соответствующий субстрат.

В данной работе активность амилазы определяется по количеству крахмала, расщепленного до неокрашивающихся йодом декстринов за единицу времени при строго определенных условиях.

**Лабораторная работа проводится на двух занятиях:** на первом готовят питательную среду, засевают и выращивают культуру гриба; на втором – экстрагируют ферменты и анализируют активность амилазы в вытяжке.

## З А Н Я Т И Е 1

Группа студентов делится на две бригады, Одна изучает влияние состава, а вторая – влияние влажности питательной среды на уровень накопления амилолитических ферментов.

### ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

1. Определить влажность сырьевых компонентов – пшеничных отрубей и опилок на приборе ПИВИ.

Просушить бумажные конверты (16 × 16 см) при 160 °С в течение трех минут и охладить в эксикаторе. Взвесить пустой пакет, заполнить отрубями или опилками и взвесить навеску 5 г. Распределить материал тонкими слоем и сушить при 160 °С шесть минут, охладить в эксикаторе и взвесить.

2. Рассчитать влажность по формуле

$$X = \frac{a - c}{a - b} 100 \%, \quad (4.1)$$

где  $a$  – масса конверта с влажной навеской, г;  $c$  – масса конверта с высушенной навеской, г;  $b$  – масса пустого конверта, г.

3. Среднюю величину влажности пшеничных отрубей и опилок рассчитать по результатам двух параллельных опытов и внести в табл. 4.1.

#### 4.1. Результаты определения влажности

№ опыта	Наименование среды	Масса навески, г		Количество испаренной влаги, г	Влажность, $W$ , %	Средняя влажность $W_{\text{ср}}$ , %
		влажной	высушенной			
1	Пшеничные отруби					
2	Пшеничные отруби					
3	Опилки					
4	Опилки					

4. Приготовить шесть вариантов питательной среды по 20 г, отличающихся соотношением пшеничных отрубей и древесных опилок, которые участвуют в разрыхлении среды, и регулировании содержания крахмала, согласно табл. 4.2.

#### 4.2. Содержание компонентов

Компоненты, %	Варианты					
	1	2	3	4	5	6
Пшеничные отруби	100	90	80	70	60	50
Древесные опилки	0	10	20	30	40	50

Рассчитать массу компонентов для каждого варианта, взвесить на технических весах. Высыпать на гладкую поверхность (стекло) опилки, отруби и смешать.

5. Рассчитать количество воды, необходимое для увлажнения среды до 60 % влажности. Уменьшить расход воды на 1 мл, учитывая посевной материал вводимый в виде суспензии конидий. Результаты расчета внести в табл. 4.3.

#### 4.3. Результаты определения расхода воды для увлажнения среды

Промежуточные данные	Варианты					
	1	2	3	4	5	6

6. Отмерить необходимое количество воды мерным цилиндром, медленно приливая ее к массе; перемешивать для равномерного увлажнения частиц. Увлажненную массу перенести в коническую колбу. Во избежание загрязнения поверхности горлышка колбы следует использовать металлическую воронку. Колбы закрыть ватной пробкой, бумажным колпачком и стерилизовать 30 мин при 120 °С в автоклаве. Содержимое колбы после стерилизации и охлаждения интенсивно встряхнуть.

7. Для изучения влияния влажности питательной среды на накопление ферментов приготовить шесть вариантов сред по 20 г с разным содержанием влаги, согласно табл. 4.4.

#### 4.4. Рекомендуемая влажность питательной среды

Показатели влажности	Варианты					
	1	2	3	4	5	6
Заданная влажность, %	45	50	55	60	65	70
Влажность среды до увлажнения, %						
Расход воды на 20 г среды, мл						

Взвесить навески пшеничных отрубей и древесных опилок по варианту 4 табл. 4.2. Рассчитать влажность среды и расход воды до достижения влажности уменьшая его на 1 мл суспензии посевного материала согласно заданию 3. Результаты расчета внести в табл. 4.3. Дальнейшие операции выполнить как в п. 6.

8. Засеять питательную среду суспензией спор гриба. Для этого в пробирку с культурой гриба на скошенной агаризованной среде налить стерильную воду до верхнего края косяка. Конидий перевести концом стерильной пипетки во взвешенное состояние и отобрать 1 мл суспензии спор, перенося ее затем в колбу со стерильной средой. После засева среду тщательно перемешать путем встряхивания и пересыпать в стерильную кювету, потом закрыть ее крышкой. Кювета имеет перфорации для воздухообмена. Операции по засеву среды необходимо производить, соблюдая асептические условия, возле пламени спиртовки. Кюветы с засеянной средой поместить в термостат. Выращивание проводить в течение 48...54 ч при температуре 33 °С в течение первых 12 ч роста и 28...30 °С – в последующие.

### З А Н Я Т И Е 2

Выросшая культура имеет вид коржа с пушистой поверхностью. Для каждого коржа следует определить влажность (для высушивания брать 3 г культуры) и амилολитическую активность.

#### Порядок выполнения работы

1. Провести экстракцию ферментов из выросшей культуры гриба. Корж тщательно измельчить в кювете с помощью шпателя и на технических весах взвесить 5 г поверхностной культуры. Шпатель обязательно погрузить в дезинфицирующий раствор. Взвешенную порцию поместить в фарфоровую ступку и тщательно растереть пестиком со 100 мл забуференной дистиллированной воды, которую получают смешивая 10 мл ацетатного буфера (рН 4,7) и 90 мл дистиллированной воды.

После чего поместить в термостат на 30 мин при 30 °С. По истечению времени экстракции содержимое фарфоровых ступок перенести на капроновый фильтр и хорошо отжать для отделения экстракта от биошрота (остатков питательной среды и мицелия).

2. Определить влажность выросшей культуры, аналогично п.1 занятия 1 данной лабораторной работы, оформить табл. 4.4.

3. Осветлить полученный экстракт (вытяжку) путем центрифугирования. Для этого мерным цилиндром отмерить 25 мл фильтрата и перенести в центрифужные стаканчики, которые устанавливают на роторе центрифуги попарно напротив друг друга. Центрифугирование длится 5 мин при 3 тыс. оборотах. Осветленный экстракт слить в колбу для дальнейшего анализа.

4. Определить амилолитическую способность (АС) экстракта, используя капельный метод (по Климовскому и Родзевич).

В основе метода лежит способность фермента амилазы, находящегося в вытяжке, катализировать гидролиз крахмала до не окрашиваемых йодом продуктов.

Для определения АС важно строго соблюдать температурные условия реакции. Для этого все растворы – субстрат (1 %-ный раствор крахмала), раствор фермента и дистиллированная вода должны быть нагреты до 30 °С в ультратермостате в течение 10 мин.

В широкую пробирку залить 25 мл раствора крахмала. Не вынимая пробирок из термостата, с помощью пипеток добавить воду, а затем вытяжку от 1 до 25 см<sup>3</sup>. Общий объем реакционной смеси должен составлять 50 см<sup>3</sup>. Если ферментная вытяжка малоактивна, то можно внести только ее в количестве 25 см<sup>3</sup>, а воду вообще не добавлять.

Содержимое в пробирке перемешать палочкой и отметить время по секундомеру, когда была добавлена вытяжка к раствору крахмала:

- каждые 60 с из пробирки, не вынимая ее из термостата, отбирать палочкой каплю пробы;
- каплю помещать на белую фарфоровую пластину, соединяя эту каплю с каплей рабочего раствора йода и наблюдать окраску;
- реакция расщепления крахмала считается оконченной, когда йод перестает давать изменение окраски при соединении с каплей испытуемого раствора в течение первых 10 с;
- изменение окраски йода отчетливо видно на границе соприкосновения двух капель – йода и реакционной смеси.

Время, за которое происходит расщепление крахмала до продуктов, не окрашиваемых йодом, должно быть в пределах 10...20 мин.

Если время гидролиза крахмала менее 10 мин, то определение повторяют, уменьшая объем вытяжки, а увеличивая объем воды. Если гидролиз крахмала не заканчивается в течение 20 мин, то анализ также повторяют, увеличивая объем ферментной вытяжки и уменьшая объем воды. Количество ферментной вытяжки, которое необходимо брать на повторный анализ, вычисляют с учетом полученного времени гидролиза.

Например, если ферментная вытяжка имеет малую или слишком высокую активность и количество ферментного раствора 1...25 см<sup>3</sup> не обеспечивает длительности гидролиза крахмала в течение 10...20 мин, для анализа берут не 25 см<sup>3</sup> раствора крахмала, а большее или меньшее его количество, например 10 или 40 см<sup>3</sup>, внося соответствующую поправку в расчетную формулу (соответственно 0,1 или 0,4 вместо обычных 0,25 г).

5. Рассчитать амилолитическую активность по формуле (4.2).

За единицу амилолитической активности (способности) принято такое количество фермента, которое катализирует расщепление 1 г растворимого крахмала до продуктов, неокрашиваемых йодом, за 1 ч при температуре 30 °С в строго определенных условиях:

$$AC = \frac{0,25 \cdot 60 \cdot 100 \cdot 50}{T \cdot a \cdot 5 \cdot (100 - W)}, \quad (4.2)$$

где 0,25 – количество крахмала, которое находится в 25 мл раствора, г; 60 – пересчет минут в часы; T – время гидролиза, мин; а – количество ферментного раствора, взятое на анализ, мл; 100 – количество экстрагирующей воды, мл; 5 – масса культуры, взятой на экстракцию, г; 50 – объем реакционной смеси; W – влажность культуры гриба, %.

6. Результаты расчетов для различных вариантов питательных сред свести в табл. 4.5.

#### 4.5. Результаты исследования

Вариант среды	Состав среды, %			Влажность культуры, %	АС, ед/г
	пшеничные отруби	древесные опилки	вода		

7. Построить графики зависимостей амилолитической активности полученных методом твердофазного культивирования ферментных препаратов от содержания пшеничных отрубей (крахмала) и влажности питательной среды.

#### Контрольные вопросы

1. Почему не рекомендуют выращивать в условиях твердофазного культивирования бактерии и дрожжи?
2. Какие параметры технологического процесса влияют на уровень накопления ферментов при твердофазном культивировании микроскопических грибов?



3. Каким методом можно воспользоваться для выделения ферментов из поверхностной культуры?
4. Что представляет собой биошрот?
5. Какова химическая природа крахмала?
6. К какому классу ферментов относится амилаза? В чем заключается механизм ее действия?
7. Как определяют количество фермента в исследуемом образце?
8. Какая величина принимается за единицу активности фермента?
9. Как можно уменьшить или увеличить время гидролиза при определении амилазной способности?
10. Как изменяется окраска реакционной смеси при добавлении раст-вора йода в процессе реакции гидролиза крахмала?

## Лабораторная работа 5

### ВЛИЯНИЕ РЕЖИМОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ФЕРМЕНТОВ НА ВЫХОД ГОТОВОГО ПРОДУКТА

Цель работы: изучение влияния условий осаждения на полноту выделения ферментов.

#### Теоретические предпосылки

Процессы выделения и очистки ферментов из таких сложных систем, как культуральная жидкость или экстракт поверхностной культуры, преследуют цель получения концентрированной формы продукта и удаления сопутствующих соединений, снижающих чистоту ферментного препарата. Эти процессы можно назвать "отделочными", так как они обеспечивают получение ферментных препаратов и кристаллов ферментов разной степени чистоты в зависимости от целевого назначения (для исследовательских целей, для пищевой промышленности, для медицинских целей, для производства моющих средств и т.д.).

Практическое применение находят следующие способы выделения и очистки ферментов – осаждение органическими растворителями, высаливание (сульфатом аммония, цинка, натрия, хлоридом натрия), изменение температуры, pH среды, мембранные методы, разные виды хроматографии, электрофорез, ультрацентрифугирование, ионообмен, адсорбция, фильтрование.

Широкое распространение, в частности для выделения ферментов из водных растворов, получил метод осаждения этанолом, изопропанолом и ацетоном. Добавление таких реагентов вызывает потерю растворимости белковых молекул и сопровождается образованием осадка из-за снижения полярности среды в присутствии неполярных органических растворителей. В водной среде энергия притяжения молекул фермента и диполей воды (энергия сольватации) превосходит взаимное притяжение молекул фермента, в связи с этим образуется устойчивый раствор. При определенной концентрации органического растворителя энергия сольватации становится меньше энергии связи между диполями воды и молекулами растворителя, так как он обладает более сильной полярностью. В результате сольватная оболочка белковой молекулы разрушается, что приводит к коагуляции белка и его осаждению.

Так как полярность различных растворителей различна, то и концентрация, вызывающая полное осаждение, будет различна. Кроме того, ферменты по-разному относятся к концентрациям используемых для осаждения органических растворителей, что часто дает возможность фракционировать комплекс ферментов.

Оптимальные условия осаждения определяются экспериментальным путем в каждом конкретном случае. Помимо вида и концентрации органического растворителя, соли на процесс осаждения и сохранение активности ферментов в осадке влияет присутствие в растворе электролитов, температура осаждения, концентрация сухих веществ в ферментном растворе, их состав и т.д.

При выполнении лабораторной работы необходимо определить оптимальное соотношение экстракта и растворителя для осаждения фермента, выход осадка по сухой массе, удельную активность осадка, потери активности, составить по результатам исследований материальный баланс.

#### Порядок выполнения работы

Лабораторная работа выполняется на трех занятиях. На первом занятии производится посев *Aspergillus oryzae* для получения поверхностной культуры, накопившей амилазный фермент. На втором занятии проводится выделение фермента методом экстрагирования. На третьем – осаждение амилазного фермента органическими растворителями.

#### З а н я т и е 1

1. Приготовить субстрат из пшеничных отрубей (70 %) и опилок (30 %). Учитывая влажность субстрата увлажнить его до 60 % влажности.
2. Увлажненную массу перенести в коническую колбу, не загрязняя горлышка колбы. Колбы закрыть ватной пробкой, бумажным колпачком и стерилизовать 30 мин при 120 °С в автоклаве. Содержимое колбы после стерилизации охладить при интенсивном встряхивании.
3. Засеять охлажденную стерильную питательную среду 1 мл суспензией спор гриба. После засева среду тщательно перемешать путем встряхивания и пересыпать в стерильную кювету, закрыть крышкой и поместить в термостат. Выращивание длится 48...54 ч при температуре 33 °С в течение первых 12 ч роста и 28...30 °С – в последующие.

#### З а н я т и е 2

Для выполнения работы группа разбивается на две подгруппы. Первой подгруппе предлагается исследовать влияние продолжительности экстрагирования, второй – объем экстрагента на выход готового продукта – амилолитического фермента.

### Часть 1

1. Перед изучением экстракции определить количество амилолитического фермента, накопившегося при поверхностном культивировании гриба *Aspergillus oryzae*. Корж тщательно измельчить в кювете с помощью шпателя, после чего шпатель обязательно погрузить в дезинфицирующий раствор. Определить массу коржа.

2. Определить влажность коржа на приборе ПИВИ аналогично п. 1 занятия 1 лабораторной работы 4 и рассчитать по формуле (4.1).

3. Провести экстракцию ферментов из выросшей культуры гриба аналогично п. 1 занятия 2 лабораторной работы 4.

4. Определить амилолитическую способность ферментов выросшей культуры капельным методом аналогично п. 4 занятия 2 лабораторной работы 4 и рассчитать по формуле (4.2).

5. Результаты измерений и расчетов свести в табл. 5.1.

### 5.1. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Вариант	Влажность гриба, $W_k$ , %	Количество ферментного раствора, взятое на анализ, а, мл	Время гидролиза, Т, мин	Амилолитическая активность, $AC_k$ , ед/г

### Часть 2

Провести водную экстракцию в соответствии с заданным количеством воды и временем настаивания (табл. 5.2.) и определить количество фермента, перешедшего в экстракт и оставшегося в биошроте.

### 5.2. Режимы проведения экстракции

Показатели	Варианты							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Количество поверхностной культуры, $M_k$ , г	5	5	5	5	5	5	5	5
Количество воды, $V_z$ , мл	200	200	200	200	100	150	250	300
Время настаивания, Т, мин	10	20	30	40	20	20	20	20

1. Поместить навеску измельченного коржа в марлевый мешочек и завязать его. Мешочек с поверхностной культурой уложить в стакан (необходимого объема). Добавить заданное количество водопроводной воды (рекомендуемая температура экстрагента 25...27 °С). По завершении времени экстракции извлечь мешочек с культурой и отжать его.

2. В получившихся экстракте и биошроте определить количество амилолитического фермента капельным методом, а также объем экстракта, влажность и массу биошрота.

Экстракт подогреть до температуры 30°. Далее следовать рекомендациям п. 4 части 1. Амилолитическую способность ( $AC$ , ед/мл) рассчитать по формуле (5.1):

$$AC = \frac{0,25 \cdot 60 \cdot 50}{Ta}, \quad (5.1)$$

где 0,25 – количество крахмала, которое находится в 25 мл раствора, г; 60 – пересчет минут в часы; Т – время гидролиза, мин; а – количество ферментного раствора, взятое на анализ, мл; 50 – объем реакционной смеси.

3. Биошрот подвергнуть повторному экстрагированию забуференной водой, в полученном экстракте определить амилолитическую способность по формуле (5.1).

4. Заполнить табл. 5.3.

### 5.3. Сводная таблица результатов экстрагирования

Вариант i	Объем экстракта, $V_i^3$	Амилолитическая способность экстракта, $AC_i^3$ , ед/мл	Масса биошрота, $M_i^3$ , г	Влажность биошрота, $W_i^3$ , %	Амилолитическая способность биошрота, $AC_i^6$ , ед/г

5. По результатам экстрагирования составить материальные балансы. Построить графики зависимости амилолитической способности экстракта от времени настаивания и количества экстрагента.

### З а н я т и е 3

Для выполнения работы группа разбивается на четыре бригады, каждая из которых исследует эффективность осаждения ферментов в соответствии с заданным вариантом концентрации органического растворителя.

### 5.4. Соотношение объемов экстракта и органического растворителя

Компоненты смеси	Вариант			
	1	2	3	4
Экстракта : этанол	1 : 2,0	1 : 2,5	1 : 3,0	1 : 3,5

В качестве исходного раствора в данной лабораторной работе используется водный экстракт (вытяжка) фермента амилазы из поверхностной культуры гриба. Экстракт охладить до температуры 5...6 °С.

1. В исходном экстракте определить концентрацию сухих веществ с помощью рефрактометра, а также уровень pH и температуру. Для достоверности результатов следует провести 2-3 отсчета. Результаты измерений записать в табл. 5.5.

### 5.5. Характеристика исходного экстракта

Вариант	Показания рефрактометра	Содержание сухих веществ, %	pH экстракта	Температура экстракта, °С
1...4				

2. Органический растворитель заблаговременно (за 2-3 часа) перед началом лабораторной работы следует поместить для охлаждения до -10...-15 °С в морозильную камеру холодильника.

3. Взвесить по две центрифужные пробирки на технических весах и зафиксировать массу в табл. 5.6.

### 5.6. Результаты эксперимента

Номер пробирки	Масса центрифужной пробирки, г		Масса важного осадка, г	Объем декантата $V_{д}$ , мл
	без осадка	с осадком		
1...4				

4. Для осаждения на рабочем столе расставить четыре химических стаканчика на 100 мл. В два из них пипеткой на 10 мл влить холодный экстракт (5...6 °С), а в другие два отмерить с помощью чистой пипетки требуемый согласно заданного варианта объем охлажденного этанола с температурой -10...-15 °С.

Аккуратно тонкой струей по стеклянной палочке растворитель приливать к экстракту при интенсивном перемешивании. При этом должно наблюдаться интенсивное образование хлопьевидного осадка.

5. С помощью пипетки отобрать из каждого стаканчика по 20 мл суспензии, перенести в предварительно взвешенные центрифужные пробирки и установить их в гнездо ротора центрифуги. Разделять суспензию в течение пяти минут, установив скорость вращения ротора 3000 об/мин.

6. После остановки ротора слить с осадка декантат, измерить мерным цилиндром его объем и взвесить центрифужные стаканчики с влажным осадком. Результаты записать в табл. 5.6.

7. Для расчета выхода осадка по сухой массе определить влажность полученного осадка методом высушивания до постоянной массы. Сушку проводить в открытых стеклянных бюксах, поместив их в сушильный шкаф при 105 °С на 3-4 ч. Охладить бюкс, вновь взвесить его и рассчитать влажность по формуле

$$W = \frac{a-b}{a-m} 100 \%, \quad (5.2)$$

где  $m$  – масса бюкса без осадка, г;  $a$  – масса бюкса с влажным осадком, г;  $b$  – масса бюкса с сухим осадком, г.

8. Для определения количества осажденного активного фермента – амилазы, использовать вторую центрифужную пробирку. В нее к осадку добавить дистиллированную воду в количестве, равном объему снятого декантата. Стеклопалочкой интенсивно перемешать осадок до полного растворения. Полученный раствор использовать для определения амилолитической активности осадка колориметрическим методом.

9. Колориметрический метод определения амилолитической активности осуществляется по следующей схеме.

В две пробирки диаметром 2 см и высотой 18 см налить по 10 см<sup>3</sup> 1 % раствора крахмала и поставить в ультратермостат с температурой 30 °C на 5...10 мин. Затем, не вынимая пробирок из термостата, добавить в первую пробирку 5 см<sup>3</sup> дистиллированной воды (контрольная), во вторую 5 см<sup>3</sup> предварительно разведенного 1 : 5 ферментного раствора (опытная). Смесь быстро перемешать и выдерживать в ультратермостате 10 мин по секундомеру.

Из реакционных смесей контрольного и опытного растворов отобрать 0,5 см<sup>3</sup> раствора и перенести их в колбы с предварительно налитыми 50 см<sup>3</sup> рабочего раствора йода. Содержимое колб перемешать. Полученные растворы должны приобрести следующую окраску: контрольный – синюю; опытный – фиолетовую (с различной интенсивностью в зависимости от количества негидролизованного крахмала).

Непосредственно после смешивания растворов определить их оптическую плотность на фотоэлектроколориметре, используя светофильтр № 3 и кюветы с толщиной поглощающего свет слоя 10 мм. Контрольным раствором при колориметрировании исследуемых растворов является дистиллированная вода.

Оптическая плотность контрольного раствора соответствует количеству исходного крахмала субстрата. Оптическая плотность опытного раствора соответствует количеству крахмала, оставшегося после действия фермента. Разница между показателями оптических плотностей соответствует гидролизованному количеству крахмала субстрата. Количество гидролизованного крахмала рассчитывать по формуле

$$C = \frac{0,1 (D_1 - D_2)}{D_1}, \quad (5.3)$$

где  $D_1$  – оптическая плотность контрольного раствора;  $D_2$  – оптическая плотность опытного раствора; 0,1 – количество крахмала, взятое для испытания в качестве субстрата, г.

Амилолитическую активность препарата рассчитывать по формуле

$$AC = \frac{100 (7,264C - 0,03766)}{n}, \quad (5.4)$$

где  $C$  – количество гидролизованного крахмала, г;  $n$  – количество фермента взятое для испытания, мг; 100 – коэффициент пересчета миллиграммов в граммы; 7,264 и 0,03766 – коэффициенты расчетного уравнения.

10. Результаты определения амилолитической активности выделенного ферментного препарата свести в табл. 5.7

### 5.7. Определение амилолитической активности

Вариант	Оптическая плотность контрольного раствора	Оптическая плотность опытного раствора	Количество гидролизованного крахмала, г	Объем ферментного раствора, мл	Влажность осадка, %	Разведение	Количество фермента для испытания, мг	Количество гидролизованного крахмала, г	Амилолитическая активность, ед/г
1...4									

11. Построить график зависимости амилолитической активности выделенного ферментного препарата от концентрации этанола.

12. Полученные в ходе выполнения лабораторной работы экспериментальные данные и результаты расчетов амилолитической активности ферментных препаратов на различных этапах выделения свести в табл. 5.8 – 5.10.

### 5.8. Культивирование

Варианты	Поверхностная культура					
	масса, г	масса на определение активности	влажность, %	масса сухого вещества, %	% от исходной среды	активность в ед. ФА на 1 г сухого вещества
1...4						

### 5.9. Экстрагирование

Варианты	Экстракция					
	масса культуры, г	объем экстрагента, мл	объем экстракта, мл	содержание СВ в экстракте, %	активность экстракта, ед. ФА, ед/мл	сумма ед. ФА в экстракте, ед.
1...4						

### 5.10. Осаждение

Варианты	Осаждение							
	объем экстракта, мл	объем растворителя, мл	масса влажного осадка, г	активность экстракта, ед/мл	активность осадка, ед/г	влажность осадка, %	активность на 1 г. сухого вещества осадка	выход активного фермента
1...4								

### Контрольные вопросы

1. Почему необходимо получать ферментные препараты различной степени очистки?
2. Перечислите способы очистки и концентрирования ферментов.
3. С чем связано многообразие способов выделения и очистки ферментных препаратов?
4. Сравните методы концентрирования и очистки, применяемые для выделения ферментов при глубинном и твердофазном культивировании.
5. На чем основан способ выделения ферментов методом осаждения? Какие реагенты используют в качестве осадителей ферментов?
6. От каких параметров зависит эффективность осаждения ферментов из культуральной жидкости органическими растворителями?
7. С какой целью этиловый спирт перед добавлением к водному экстракту фермента охлаждают?
8. В чем заключается колориметрический метод определения амилолитической активности ферментов?
9. Как рассчитать материальный баланс при выделении амилолитических ферментов из поверхностной культуры?
10. Объясните полученный график зависимости амилолитической активности выделенного ферментного препарата от концентрации этанола.

## Лабораторная работа 6

### ПОЛУЧЕНИЕ БЕЛКОВЫХ КОНЦЕНТРАТОВ И ИЗОЛЯТОВ

Цель работы: освоение методов выделения белков из белоксодержащих продуктов и их количественного определения

#### Теоретические предпосылки

Для получения пищевого белка используют пшеницу, сою, овес, лен, подсолнечник, кунжут, чечевицу, горох, побочные продукты переработки зерна, зеленые части растений, микробную биомассу.

Белокосодержащие продукты делят на три группы: белковые изоляты (содержание сырого протеина не менее 85 %), белковые концентраты (не менее 65 % сырого протеина) и белковые продукты (не менее 30 % сырого протеина).

Белковые продукты из пшеничных отрубей получают методом щелочной или кислотной экстракции. По первому способу отруби обрабатывают 0,2 %-ным водным раствором гидроксида натрия при 50...60 °С и получают экстракт, от которого центрифугированием или прессованием отделяют нерастворимый остаток. Экстракт центрифугируют и получают крахмалобелковый продукт и осветленный экстракт. Из осветленного экстракта при подкислении соляной кислотой осаждают белок, который отделяют центрифугированием от сыворотки, промывают и сушат.

При получении белковых препаратов из побочных продуктов переработки зерновых культур целесообразно использование ферментных препаратов цитолитического, пектолитического и гемицеллюлазного действия, облегчающие доступ растворителей к белку. Результатом является повышение выхода препаратов с 9...11 до 11...14 % к массе сырья.

Белковые препараты из отрубей содержат не менее 60 % белка, обладают высокими функциональными свойствами и биологической ценностью. Лимитирующей аминокислотой является изолейцин (скор 88 %). Препараты могут применяться как улучшители или обогатители в производстве хлебобулочных, кондитерских, колбасных изделий, пасты к завтраку и др.

Основные стадии технологии фракционирования листостебельной массы однолетних и многолетних трав включают: измельчение и отжим биомассы, получение зеленого сока, коагуляцию белков, разделение коагулированного сока на белковую пасту и коричневый сок, сгущение коричневого сока и сушка пасты. Проблема заключается в том, что при измельчении зеленых частей растений разрушаются стенки их клеток. Мембраны хлоропластов также разрушаются и их белки смешиваются с белками цитоплазмы, переходя в клеточный сок. Частицы, содержащие хлорофилл и продукты его распада, очень устойчивы к осаждению, цитоплазматические ферменты вызывают гидролиз белка, а фенольные соединения вакуолей и пектины клеточных стенок могут изменять структуру белка и ухудшать цвет препаратов. Поэтому технологии включают приемы, направленные на исключение необходимости очистки сока от хлорофилла, пектинов и коричневых пигментов.

Технология производства соевых белковых концентратов предусматривает три способа очистки белков от углеводов: кислотную промывку соевой обезжиренной муки; экстракцию белков раствором этанола; денатурацию белков посредством влаготепловой обработки с последующей экстракцией водой. Функциональные свойства полученных такими способами белков при необходимости улучшают обработкой паром или гомогенизацией.

Соевые белковые изоляты являются наиболее очищенной формой белковых препаратов, так как содержат не менее 90 % белка в пересчете на абсолютно сухое вещество (СВ) (табл. 6.1). Из измельченного белого лепестка слабощелочным раствором (рН 8...11) белок экстрагируется, осаждается в изoeлектрической точке (4,2...4,5) и отделяется от олигосахаридов в виде творожистой массы. Белок промывается, нейтрализуется до рН 6,8 и сушится распылительным способом.

Применяя осаждение белка при значениях рН, отличных от изoeлектрической точки, получают соевые изоляты, растворяющиеся при различных значениях реакции среды, а дополнительное обогащение их кальцием, гранулирование улучшает пищевую ценность, физико-химические свойства и расширяет сферы использования.

### 6.1. Химический состав соевых препаратов

ПОКАЗАТЕЛИ	КОНЦЕНТРАТЫ		ИЗОЛЯТЫ	
	% ОТ МАССЫ	% НА СВ	% ОТ МАССЫ	% НА СВ
БЕЛОК (N × 6,25)	62...69	65...72	86...87	90...92
ЖИР (ПЕТРОЛЕЙНЫЙ ЭФИР)	0,5...1,0	0,5...1,0	0,5...1,0	0,5...1,0
СЫРАЯ КЛЕТЧАТКА	3,4...4,8	3,5...5,0	0,1...0,2	0,1...0,2
ЗОЛЬНОСТЬ	3,8...6,2	4,0...6,5	3,8...4,8	4,0...5,0
ВЛАГА	4...6	0	4...6	0
УГЛЕВОДЫ (ОСТАТОК)	19...21	20...22	3...4	3...4

Сухая пшеничная клейковина – продукт, получаемый методом водной экстракции небелковых и растворимых белковых компонентов из пшеницы или пшеничной муки. Процесс осуществляется на специализированных предприятиях или заводах крахмального производства. В мире разработано около 15 схем процесса получения клейковины, различающихся по виду исходного сырья (зерно, мука), методу отделения белка от крахмала (механический, ферментативный, химический), качеству конечного продукта (денатурированная и неденатурированная клейковина) и способу получения (из теста или из мучной болтушки). К способам получения сухой клейковины предъявляются требования получения максимального выхода, сохранения нативных свойств, рационального использования побочных продуктов и утилизации сточных вод. При использовании зерна во всех способах имеются общие операции: замачивание, размалывание, отделение крахмала от клейковины и сушка продукта.

Для получения белковых препаратов из биомассы хлебопекарных и пивных дрожжей используют автолиз и ферментативный лизис с помощью дрожжелитических ферментных препаратов и протеаз обычного типа.

Лизис дрожжей с использованием ферментных препаратов по сравнению с автолизом представляет более широкие возможности для получения продуктов различного состава. Применение ферментных препаратов специфического действия позволяет быстро удалить клеточную стенку, а из освободившихся протопластов выделить продукты различной степени гидролиза в зависимости от целевого назначения. Для получения недеградированных цитоплазматических компонентов следует использовать биомассу с низкой автолитической активностью. Ферментативный лизис клеточных стенок дрожжей проводят с помощью различных ферментов и мультиэнзимных композиций.

Способы получения продуктов глубокого расщепления основываются на сочетании автолиза дрожжей и их лизиса препаратами литического или протеолитического действия. Для активации протеолиза дрожжей используют растительные, животные и микробные протеазы. Протеазы могут быть неспецифичными по отношению к дрожжевому белку, но в сочетании с автолитическими протеазами дрожжей дают хороший эффект. Так, например, папаин, пепсин, протосубтилин Г10х в соотношении с белком пекарских дрожжей 1 : 1000 гидролизуют его не более чем на 4 %, а добавление этих препаратов в том же соотношении к белку автолизирующихся дрожжей через 5 ч после начала автолиза позволяет через час получить глубину гидролиза белка 95 %. В контроле этот уровень достигается лишь после 20 ч автолиза.

С применением препарата Лизосубтилина Г10х разработан способ получения белково-витаминного обогатителя пищи из гидролизных дрожжей рода *Candida*. Процесс включает следующие операции: кормовые дрожжи с влажностью 75...90 % нагревают до температуры 46...50 °С, вносят Лизосубтилин в количестве 0,2...0,5 % к сухому веществу дрожжей, проводят гидролиз в течение 20...30 ч при постоянной температуре и перемешивании. Затем непрогидролизованные остатки клеток отделяют сепарацией, а жидкую фазу высушивают. Сухой продукт представляет собой порошок соломенно-желтого цвета с приятным пищевым запахом. Содержание аминного азота составляет 4,3 %, около половины определяемых аминокрупп принадлежат свободным аминокислотам, среди которых преобладают аланин, лизин, лейцин (соответственно 16,0; 15,7 и 12,4 %).

Лизосубтилин может использоваться для получения белковых продуктов из дрожжей спиртового производства. Эти дрожжи обладают заметной автолитической активностью, причем оптимальные условия автолиза и лизиса Лизосубтилином совпадают, что позволяет вести процесс при постоянных значениях рН и температуры (рН 6,3–6,8, температура 50...55 °С). При дозе препарата 0,1 % к сухим веществам биомассы дрожжей выход растворимых форм азота и углеводов возрастает в 2-2,5 раза (по сравнению с автолизом), через 6 ч в жидкую фазу ферментолита переходит около половины азотистых соединений и треть углеводов. Выход аминного азота составляет около 3 % к сухой массе дрожжей.

Модифицированные белки (частично или полностью гидролизованные) получают из белковых продуктов с применением протеолитических, ферментных препаратов (пепсин, папаин, бромелаин) или кислотного гидролиза. Они используются как функциональные и вкусовые добавки к пище.

### Порядок выполнения работы

На лабораторной работе группа студентов делится на две бригады, первая бригада выделяет белок из муки злаковых культур, вторая – из измельченных бобовых культур.

1. Для создания лучших условий экстрагирования белков необходимо просеять муку, выделяя фракцию с размером частиц не более 100 мкм, и отбрасывая оболочки и более крупные частицы, богатые крахмалом.

2. Взвесить в химическом стакане навеску муки массой 10 г, постепенно прилить к ней 60 мл 10 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  суспензию настаивать 10...15 мин для растворения белков. Содержимое стакана разлить поровну в две центрифужные пробирки.

3. Разделить суспензию на центрифуге при скорости вращения ротора 500 об/мин и продолжительности процесса центрифугирования 10 мин.

4. Фугат собрать в чистый химический стакан и определить с помощью биуретового метода Яроша концентрацию белка.

5. Для этого в пробирку объемом 20 мл прилить 2,4 мл раствора мочевины, 0,1 мл фугата и 2,5 мл биуретового реактива. Записать время внесения биуретового реактива. Смесь хорошо перемешать и поместить в водяную баню с температурой 40 °С на 10 мин. Затем охладить ее до 20 °С под струей холодной воды или на воздухе.

6. Через 30 минут после внесения биуретового реактива определить оптическую плотность раствора, пользуясь кюветами № 5 и светофильтром № 6 ФЭК-56. Количество белка определить по предвательно построенной калибровочной кривой.

7. В три пробирки объемом 20 мл налить по 5 мл фугата и провести экстракцию белков раствором сульфата алюминия разной концентрации.

В первую пробирку добавить 5 мл 0,5 %  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  с температурой 3...5 °С, во вторую – 5 мл 2,5 %  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  с температурой 3...5 °С, в третью – 5 мл 5 %  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  с температурой 3...5 °С. Содержимое каждой из пробирок тщательно перемешать и провести высаливание белков при температуре 3...5 °С (в холодильнике) в течение 15 мин.

8. Образовавшийся осадок отделить фильтрованием через складчатый фильтр.

9. В фильтрате определить количество белка с помощью биуретового метода Яроша в соответствии с пунктами 5 и 6.

10. Рассчитать коэффициент извлечения белка

$$B = \frac{c_n - c_k}{c_n} \quad (6.1)$$

где  $c_n$  – концентрация белка в фугате, г/л;  $c_k$  – концентрация белка в фильтрате, г/л.

11. Полученные экспериментальные данные и результаты расчетов внести в табл. 6.2.

**6.2. Экспериментальные данные и результаты расчетов  
выделения белков из белоксодержащих продуктов**

Показатели	Фугат	Фильтрат после осаждения $Al_2(SO_4)_3$ , %		
		0,5	2,5	5
Время внесения биуретового реактива				
Средняя оптическая плотность				
Количество растворенного белка				
Доля извлеченного белка				

12. Построить график зависимости концентрации остаточного белка от концентрации экстрагента и сравнить эффективность выделения белка из различного сырья.

**Контрольные вопросы**

1. Чем отличаются белковые изоляты, белковые концентраты и белковые продукты?
2. Каково целевое назначение белковых концентратов и изолятов?
3. Какое сырье используют для получения белковых концентратов?
4. Чем отличаются технологии получения белковых продуктов из различных видов сырья?
5. Какие способы используют для выделения и очистки белковых концентратов и изолятов?
6. С какой целью в технологии белковых изолятов используют ферментные препараты?
7. Какие методы используются в лабораторной работе для выделения белков и их количественного определения?
8. От каких факторов зависит эффективность выделения белка?
9. К какой группе белоксодержащих продуктов относятся выделенные из муки злаковых и бобовых культур образцы?
10. В чем заключается сущность биуретового метода определения концентрации белков?



## ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

---

---

### 1. ТЕСТ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ ПО ТЕХНОЛОГИИ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ

- Укажите, какое из перечисленных уравнений отражает химизм биосинтеза уксусной кислоты:
  - $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 + E$
  - $C_2H_5OH + O_2 \rightarrow CH_3COOH + H_2O + E$
  - $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_4OHCOOH + E$
  - $C_{12}H_{22}O_{11} \rightarrow 2C_6H_8O_7 + 3H_2O + E$
- Основным видом сырья для биотехнологического способа получения лимонной кислоты является ...
  - этанол
  - сахароза
  - мальтоза
  - меласса
- Основным видом сырья для биотехнологического способа получения уксусной кислоты является ...
  - этанол
  - кразмал
  - меласса
  - глюкоза
- Укажите, для получения какой из органических кислот в качестве продуцентов используют бактерии *Bacterium curvum*:
  - молочной
  - лимонной
  - уксусной
  - яблочной
- Укажите, какую из органических кислот образуют бактерии *Bacterium schutzenbachii*:
  - молочную
  - лимонную
  - уксусную
  - глюконовую
- Укажите, какую из органических кислот получают биотехнологическим способом в батарее реакторов:
  - молочную
  - лимонную
  - уксусную
  - итаконовую
- Укажите, для получения какой из органических кислот в качестве продуцентов используют микроскопические грибы *Bacterium curvum*:
  - молочной
  - лимонной
  - уксусной
  - яблочной
- Укажите, какой фермент катализирует процесс получения молочной кислоты:
  - алкогольоксидаза
  - лактатдегидрогеназа
  - лактатоксидаза
- Продолжительность культивирования при производстве уксусной кислоты составляет ...
  - 1...2 сут
  - 3...4 сут
  - 5...6 сут
  - 7...8 сут
- Оптимальной температурой биосинтеза молочной кислоты является температура ...
  - 26...28 °C
  - 34...36 °C

- 3) 40...43 °C
- 4) 48...50 °C

11. Содержание лимонной кислоты в культуральной жидкости в конце культивирования составляет ...
- 1) 3...5 %
  - 2) 5...10 %
  - 3) 12...15 %
  - 4) 18...20 %
12. Оптимальное значение pH при получении молочной кислоты составляет ...
- 1) 3,0...3,2
  - 2) 4,4...4,6
  - 3) 6,3...6,5
  - 4) 7,0...7,2
13. Какой процесс предшествует кислотообразованию при биотехнологическом способе производства лимонной кислоты:
- 1) спорообразование
  - 2) образование мицелия
  - 3) долив раствора мелассы
  - 4) аэрация
14. Укажите, каким из перечисленных способов можно получить концентрированный раствор уксусной кислоты:
- 1) упаривание
  - 2) перегонка
  - 3) фильтрация
  - 4) осветление
  - 5) вымораживание
  - 6) диализ
15. Укажите, каким способом очищают культуральную жидкость в производстве уксуса столового:
- 1) упаривание
  - 2) перегонка
  - 3) фильтрация
  - 4) осветление
  - 5) вымораживание
  - 6) сепарирование
16. Укажите, какое вещество используют для осветления уксусной кислоты:
- 1) активированный уголь
  - 2) сульфид бария
  - 3) гипс
  - 4) бентонит
17. Какую концентрацию имеет уксусная эссенция:
- 1) 9 %
  - 2) 70 %
  - 3) 98 %
  - 4) 99,9 %
18. Какую концентрацию имеет товарная форма молочной кислоты:
- 1) 20 %
  - 2) 40 %
  - 3) 60 %
  - 4) 80 %
19. Укажите, какое вещество используют для очистки молочной кислоты:
- 1) активированный уголь
  - 2) серную кислоту
  - 3) гипс
  - 4) бентонит
20. На какой технологической стадии в производстве молочной кислоты образуется лактат кальция:
- 1) упаривание
  - 2) фильтрация
  - 3) кристаллизация
  - 4) сушка
21. Расставьте цифры операций в соответствии с технологией получения молочной кислоты из сброженного раствора:
- 1) осветление
  - 2) центрифугирование
  - 3) кристаллизация
  - 4) разложение лактата кальция
  - 5) упаривание

б) фильтрование

22. Укажите название соли, которая не образует осадка при нейтрализации культуральной жидкости в производстве лимонной кислоты:

- 1) оксалат кальция
- 2) цитрат кальция
- 3) глюконат кальция

23. Какой реактив используют на стадии химической очистки, чтобы получить раствор лимонной кислоты:

- 1) активированный уголь
- 2) сульфид бария
- 3) гипс
- 4) серная кислота

24. Укажите, какая химическая реакция соответствует процессу образования осадка цитрата кальция:

- 1)  $2C_6H_8O_7 + 3Ca(OH)_2 \rightarrow Ca_3(C_6H_5O_7)_2 + 6H_2O$
- 2)  $2C_6H_{12}O_7 + Ca(OH)_2 \rightarrow Ca(C_6H_{11}O_7)_2 + H_2O$
- 3)  $C_2H_2O_4 + Ca(OH)_2 \rightarrow CaC_2O_4 + 2H_2O$

## 2. ТЕСТ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ ПО ТЕХНОЛОГИИ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

1. Укажите, к какой группе химических соединений относятся ферменты:

- 1) нуклеиновые кислоты
- 2) аминокислоты
- 3) белки
- 4) липиды

2. Укажите, какой из вариантов ответов указывает на механизм каталитического действия ферментов:

- 1) увеличивает частоту столкновений молекул реагирующих веществ
- 2) повышает внутримолекулярную энергию веществ
- 3) ослабляет внутримолекулярные связи молекулы субстрата

3. Укажите, к какому классу относятся ферменты, катализирующие реакции окисления и восстановления:

- 1) лиазы
- 2) лигазы
- 3) гидролазы
- 4) оксидоредуктазы
- 5) трансферазы
- 6) изомеразы

4. Укажите, к какому классу относятся ферменты, катализирующие реакции гидролитического расщепления сложных органических соединений:

- 1) оксидоредуктазы
- 2) трансферазы
- 3) гидролазы
- 4) лиазы
- 5) изомеразы
- 6) лигазы

5. Укажите, к какому классу относятся ферменты, катализирующие реакции переноса атомных группировок от одного соединения к другому:

- 1) оксидоредуктазы
- 2) трансферазы
- 3) гидролазы
- 4) лиазы
- 5) изомеразы
- 6) лигазы

6. Укажите, к какому классу относятся ферменты, катализирующие реакции негидролитического расщепления:

- 1) оксидоредуктазы
- 2) трансферазы
- 3) гидролазы
- 4) лиазы
- 5) изомеразы
- 6) лигазы

7. Укажите, какая часть в наименовании ферментного препарата Пектофоедин ГЗх указывает на его основной фермент:
- 1) ин
  - 2) пект
  - 3) фоеид
  - 4) Г
  - 5) Зх
8. Укажите, какая часть в названии ферментного препарата Амилоризин П10х указывает вид продуцента:
- 1) ин
  - 2) 10х
  - 3) амил
  - 4) ориз
  - 5) П
9. Укажите, какая часть в названии ферментного препарата Амилоризин П10х указывает на степень очистки:
- 1) ин
  - 2) 10х
  - 3) амил
  - 4) ориз
  - 5) П
10. Укажите, какая часть в названии ферментного препарата Амилоризин П10х указывает на способ ферментации его продуцента:
- 1) ин
  - 2) 10х
  - 3) амил
  - 4) ориз
  - 5) П
11. Укажите место локализации экзоферментов при ферментации их продуцента:
- 1) внутри клеток
  - 2) в культуральной жидкости
  - 3) в биомассе
12. Назовите группу микроорганизмов, которые используют при твердофазной ферментации в технологии производства ферментов:
- 1) актиномицеты
  - 2) бактерии
  - 3) грибы
  - 4) дрожжи
13. Укажите тип посевного материала, используемый для засева питательных сред при глубокой ферментации продуцентов-ферментов:
- 1) спорный
  - 2) поверхностная культура
  - 3) вегетативный
14. Какие функции выполняет воздух, подаваемый на аэрацию при твердофазном культивировании:
- 1) снабжение кислородом
  - 2) отвод тепла
  - 3) перемешивание
  - 4) отвод  $CO_2$
  - 5) передавливание
15. Укажите, какую влажность должна иметь питательная среда при твердофазном культивировании продуцентов ферментов:
- 1) 45...50 %
  - 2) 68...72 %
  - 3) 58...63 %
16. Распределить операции в последовательности, необходимой для получения ферментного препарата с индексом П10х:
- 1) фильтрование
  - 2) дезинтеграция
  - 3) осаждение
  - 4) экстракция
  - 5) осветление

- 6) промывка осадка
- 7) сушка
- 8) упаривание

17. Укажите, какие компоненты можно использовать для приготовления питательной среды при глубинном культивировании продуцентов ферментов:

- 1) пшеничные отрубы
- 2) крахмал
- 3) кукурузный экстракт
- 4) минеральные соли
- 5) свекловичный жом
- 6) кукурузная мука
- 7) меласса

18. Укажите, какие технологические операции и в какой последовательности необходимо выполнить для получения ферментного препарата с индексом Г10х:

- 1) экстракция
- 2) фильтрование
- 3) осветление
- 4) упаривание
- 5) охлаждение
- 6) осаждение
- 7) отстаивание
- 8) сепарирование
- 9) сушка

19. Какой из нижеперечисленных реагентов чаще всего применяется на практике для выделения ферментов из культуральной жидкости, экстракта:

- 1) сульфат аммония
- 2) метанол
- 3) этанол
- 4) хлорид натрия
- 5) изопропанол
- 6) сульфат цинка

20. Какая из перечисленных технологических стадий не требуется при выделении ферментов из вытяжки поверхностной культуры гриба, но необходима при выделении из культуральной жидкости:

- 1) осветление
- 2) охлаждение
- 3) осаждение
- 4) концентрирование

21. Как называется технологическая операция, обеспечивающая разделение смеси ферментов:

- 1) высаливание
- 2) фракционное осаждение
- 3) сепарирование
- 4) фильтрование

22. При реализации какого из перечисленных методов наблюдается потеря растворимости белковых молекул, что и используется при выделении и очистке ферментов:

- 1) электрофорез
- 2) ультрафильтрация
- 3) диализ
- 4) осаждение органическими растворителями
- 5) адсорбция
- 6) гельхроматография

23. Укажите, какие химические соединения используют фракционировании ферментных растворов:

- 1)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 2)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 3)  $\text{CH}_3\text{COOH}$
- 4)  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
- 5)  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$
- 6)  $\text{CH}_3-(\text{NH}_2)-\text{COOH}$

24. Сольватная оболочка фермента разрушается, если ...

- 1) изменяется полярность среды
- 2) энергия связи растворителя и воды меньше энергии связи

между диполями воды и фермента

3) молекулы воды теряют растворимость и коагулируют

25. Из перечисленных технологических операций в производстве ферментов назовите следующую за высаливанием:

- 1) электрофорез
- 2) ультрафильтрация
- 3) диализ
- 4) осаждение органическими растворителями
- 5) адсорбция
- 6) гельхроматография

26. Какой из нижеперечисленных органических растворителей не следует использовать в технологии производства очищенных ферментных препаратов для пищевых производств:

- 1) ацетон
- 2) изопропанол
- 3) этанол
- 4) метанол

27. Какой из перечисленных органических растворителей при осаждении дает трудно высушиваемые осадки ферментов:

- 1) ацетон
- 2) изопропанол
- 3) этанол
- 4) метанол

28. Какая из перечисленных технологических операции позволяет разделить ферменты по молекулярной массе:

- 1) электрофорез
- 2) ультрафильтрация
- 3) диализ
- 4) осаждение органическими растворителями
- 5) адсорбция
- 6) гельхроматография

29. Какой из перечисленных методов эффективен для удаления низкомолекулярных соединений и ферментных растворов:

- 1) электрофорез
- 2) ультрафильтрация
- 3) диализ
- 4) осаждение органическими растворителями
- 5) адсорбция
- 6) гельхроматография

30. Укажите, какие из перечисленных технологических операций являются завершающими в технологии ферментных препаратов:

- 1) сепарирование
- 2) сушка
- 3) промывка осадка
- 4) охлаждение
- 5) стандартизация
- 6) смешение

### 3. ТЕСТ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ ПО ТЕХНОЛОГИИ БЕЛКОВ

1. Какая из трех белкосодержащих добавок содержит 85 % сырого протеина:

- 1) белковый изолят
- 2) белковый концентрат
- 3) белковый продукт

2. Укажите наименования культур растений, плоды которых наряду с микробной биомассой используют для получения белкосодержащих добавок:

- 1) отруби
- 2) соя
- 3) зародыш
- 4) чечевица
- 5) табак
- 6) клевер
- 7) подсолнечник
- 8) сахарная свекла
- 9) горох

- 10) овес
3. Какой экстрагент используют для выделения белка из пшеничных отрубей:
- 1) питьевая вода
  - 2) раствор щелочи
  - 3) раствор кислоты
  - 4) рассол
  - 5) сироп
4. Обработка каким БАВ повышает выход белка из продуктов переработки зерна:
- 1) витамины
  - 2) флавоноиды
  - 3) ферменты
  - 4) гормоны
  - 5) аминокислоты
5. Разместите номера технологических операций в соответствии со схемой получения белоксодержащих добавок из листо-стебельной массы растений:
- 1) сушка пасты
  - 2) измельчение
  - 3) сгущение сока
  - 4) отжим биомассы
  - 5) разделение скоагулированного сока
  - 6) коагуляция белков
6. Какие способы очистки белков от углеводов используют в производстве соевых белковых концентратов:
- 1) фильтрование
  - 2) кислая промывка
  - 3) влаготепловая обработка
  - 4) высаливание
  - 5) осмос
  - 6) экстракция спиртовым раствором
  - 7) вымораживание
7. Какая из технологических операций получения соевого изолята требует достижения изоэлектрической точки:
- 1) обезжиривание
  - 2) экстракция
  - 3) осаждение
  - 4) промывка раствором HCl
8. Какие из перечисленных методов используют для разделения крахмала от белка при получении клейковины пшеницы как белковой добавки:
- 1) химический метод
  - 2) ферментный катализ
  - 3) перегонка
  - 4) ферментный гидролиз
  - 5) центрифугирование
  - 6) фильтрация
9. Какие из перечисленных ферментов участвуют в автолизе и лизисе биомассы при получении белковых препаратов из дрожжей:
- 1) амилазы
  - 2) протеазы
  - 3) целлюлозы
  - 4) липазы
  - 5) пектиназы
  - 6) оксидоредуктазы
10. По каким параметрам можно судить о завершении автолиза дрожжей:
- 1) концентрации сухих веществ
  - 2) температура смеси
  - 3) pH среды
  - 4) отсутствие роста клеток
  - 5) содержание аминного азота
  - 6)  $\text{NH}_2$  среды
11. Какие условия способствуют автолизу дрожжей:
- 1) pH 7,0...7,5;  $t = 60...65$  °C; СВ = 1...5 %;  $\tau = 5...6$  ч
  - 2) pH 4,5...5,0;  $t = 55...60$  °C; СВ = 5...8 %;  $\tau = 4...5$  ч
  - 3) pH 5,5...6,5;  $t = 45...53$  °C; СВ = 10 %;  $\tau = 15...30$  ч
12. Какие из органических растворителей предлагают использовать при проведении автолиза дрожжей:
- 1) этанол

- 2) толуол
  - 3) хлороформ
  - 4) эфир
  - 5) ацетон
  - 6) пропанол
13. Какими методами пользуются для удаления из автолизата дрожжей нуклеиновых кислот:
- 1) центрифугирование
  - 2) осмос
  - 3) сорбцию
  - 4) экстракцию
  - 5) осаждение
14. Какие аминокислоты преобладают в готовом автолизате дрожжей:
- 1) треонин
  - 2) гистидин
  - 3) аланин
  - 4) глицин
  - 5) фенилаланин
  - 6) лизин
  - 7) изолейцин
  - 8) лейцин
15. Отходы какого производства служат хорошим сырьем для получения пищевых добавок путем лизиса:
- 1) молочнокислые бактерии
  - 2) аминокислоты
  - 3) пивные дрожжи
  - 4) спиртовые дрожжи
  - 5) базидиальные грибы
  - 6) этилового спирта
16. Какой из перечисленных отходов получения автолизата служит хорошей добавкой для препаков для сельского хозяйства, звероводства, рыбоводства:
- 1) клеточные стенки
  - 2) нуклеиновые соединения
  - 3) промывные воды
17. Как называют дрожжевую клетку после удаления лизисом у нее оболочки:
- 1) протеолиз
  - 2) протеаза
  - 3) протопласт
  - 4) хлоропласт
  - 5) плазмолит
18. Какие ферменты можно использовать для автолиза дрожжей:
- 1) лизосубтилин
  - 2) протосубтилин
  - 3) пектофетицин
  - 4) амилоризин
19. Какие операции являются общими для всех технологических схем получения сухой пшеничной клейковины:
- 1) замачивание
  - 2) лизис
  - 3) сорбция
  - 4) осаждение
20. Расставьте цифры после операций в соответствии с технологией получения шампиньонов:
- 1) стерилизация
  - 2) смешивание компонентов субстрата
  - 3) смешение с покровным материалом
  - 4) рост мицелия
  - 5) термообработка камер с субстратом
  - 6) сбор урожая
  - 7) плодообразование и рост плодовых тел
  - 8) утилизация субстрата



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

---

---

Представленный в учебном пособии материал подтверждает необходимость обеспечения трех основных условий для эффективной реализации биотехнологий в промышленных масштабах:

- использование высокопродуктивных штаммов продуцентов (очищенных ферментов или мультиэнзимных композиций);
- поддержание оптимальных условий для осуществления требуемого процесса биосинтеза биомассы или продуктов метаболизма;
- выбор рациональных способов выделения целевого продукта из ферментационной смеси, его концентрирования и очистки.

Сложность биотехнологических процессов и многоэтапность биотехнологических производств вызывает необходимость привлечения к их осуществлению специалистов различного профиля – не только "чистых" биотехнологов, но и генетиков, молекулярных биологов, биохимиков, микробиологов, конструкторов, специалистов по эксплуатации оборудования и автоматизации производства. Однако и специалисты в области пищевой биотехнологии должны быть компетентны в вышперечисленных смежных областях науки и техники.

Повышение эффективности биотехнологии органических кислот и белковых препаратов и их использования в производстве пищевых продуктов возможно только за счет системного подхода к рассмотрению биотехнологических процессов и интеграции возможностей биологических и химических методов с современными инженерными приемами.

## СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

---

---

1. Бирюков, В.В. Основы промышленной биотехнологии / В.В. Бирюков. – М. : КолосС, 2004.
2. Грачева, И.М. Технология микробных белковых препаратов, аминокислот и биоэнергия / И.М. Грачева, Л.А. Иванова, В.М. Кантере. – М. : Колос, 1992.
3. Грачева, И.М. Технология ферментных препаратов / И.М. Грачева. – М. : Агропромиздат, 1985.
4. Егорова, Т.А. Основы биотехнологии / Т.А. Егорова, С.М. Клунова, Е.А. Живухина. – М. : Изд. центр "Академия", 2005.
5. Калунянц, К.А. Микробные ферментные препараты / К.А. Калунянц, Л.И. Голгер. – М. : Пищевая промышленность, 1989.
6. Кислухина, О.В. Ферменты в производстве пищи и кормов / О.В. Кислухина. – М. : КолосС, 2002.
7. Манаков, М.Н. Теоретические основы промышленной биотехнологии / М.Н. Манаков, Д.Г. Победимский. – М. : Высшая школа, 1989. – 310 с.
8. Мосичев, М.С. Общая технология микробиологических производств / М.С. Мосичев, А.А. Складнев, В.Б. Котов. – М. : Легкая и пищевая промышленность, 1982.
9. Пищевая биотехнология : в 4 кн. / И.А. Рогов [и др.]. – М. : КолосС, 2004.
10. Смирнов, В.А. Пищевые кислоты / В.А. Смирнов. – М. : Легкая и пищевая промышленность, 1983.

## СОДЕРЖАНИЕ

---

---

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	3
<b>ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ТЕХНОЛОГИИ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ И БЕЛКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ</b> .....	4
1. Биотехнология органических кислот .....	4
2. Биотехнология белковых препаратов .....	11
<b>ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ ПО ПОЛУЧЕНИЮ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ И БЕЛКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ</b> .....	28
Лабораторная работа 1. Получение уксусной кислоты .....	28
Лабораторная работа 2. Получение безалкогольного напитка при выращивании комплекса микроорганизмов чайного гриба .....	33
Лабораторная работа 3. Изучение особенностей биосинтеза лимон- ной кислоты при поверхностном культи- вировании микроскопических грибов .....	38
Лабораторная работа 4. Влияние состава питательной среды на накопление амилазы при твердофазном культивировании микомицета .....	42
Лабораторная работа 5. Влияние режимов выделения ферментов на выход готового продукта .....	50
Лабораторная работа 6. Получение белковых концентратов и изолятов .....	58
<b>ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ</b> .....	64
1. Тест для контроля знаний по технологии органических кислот	64
2. Тест для контроля знаний по технологии ферментных препаратов .....	68
3. Тест для контроля знаний по технологии белков .....	74
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....	78
<b>СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	79