Учреждение образования
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Н. Ю. Адамцевич, Д. С. Сергиевич,
Т. М. Тананайко

ТЕХНОЛОГИЯ ПРОДУКТОВ БРОЖЕНИЯ

Лабораторный практикум

Рекомендовано
учебно-методическим объединением
по химико-технологическому образованию
в качестве учебно-методического пособия
для студентов учреждений высшего образования
по специальности 7-07-0711-02 «Промышленная биотехнология»

Минск 2024

УДК 663.031.1(076.5)(075.8)
ББК 28.4я73
А28

Р е ц е н з е н т ы :
кафедра микробиологии Белорусского государственного университета (кандидат биологических наук, доцент, профессор кафедры *В. В. Лысак*);
кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник отдела Научно-производственного центра биотехнологий ГНУ «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси» *Л. В. Романова*

Все права на данное издание защищены. Воспроизведение всей книги или ее части не может быть осуществлено без разрешения учреждения образования «Белорусский государственный технологический университет».

Адамцевич, Н. Ю.

А28 Технология продуктов брожения. Лабораторный практикум : учеб.-метод. пособие для студентов специальности 7-07-0711-02 «Промышленная биотехнология» / Н. Ю. Адамцевич, Д. С. Сергиевич, Т. М. Тананайко. – Минск : БГТУ, 2024. – 80 с.
ISBN 978-985-897-159-5.

Лабораторный практикум содержит теоретический материал по разным видам брожения: спиртовому, молочнокислому, уксуснокислому, лимоннокислому, пропионовокислому. В него включены лабораторные работы для закрепления теоретических основ, приобретения навыков использования микроорганизмов с целью получения различных продуктов брожения и отработки химических и микробиологических методов их анализа.

УДК 663.031.1(076.5)(075.8)
ББК 28.4я73

ISBN 978-985-897-159-5

© УО «Белорусский государственный технологический университет», 2024
© Адамцевич Н. Ю., Сергиевич Д. С., Тананайко Т. М., 2024

ПРЕДИСЛОВИЕ

Под брожением понимают процесс преобразования сложных высокоэнергетических органических веществ, в основном углеводов, в более простые под действием ферментных систем микроорганизмов. В промышленности множество продуктов получают с использованием таких видов брожения, как спиртовое, молочнокислое, ацетоновобутиловое и др. Отрасли производства, основанные на процессе брожения, относятся к бродильной промышленности.

В бродильных производствах применяют различные микроорганизмы: дрожжи (производство этилового спирта, глицерина, хлебопекарных и кормовых дрожжей, вина, пива и кваса); бактерии (производство органических растворителей – ацетона и бутилового спирта, производство уксуса, молочной, масляной, пропионовой кислот); плесневые грибы (производство лимонной, глюконовой, итаконовой, фумаровой кислот).

Во всех бродильных производствах не может быть обеспечено надлежащее качество без микробиологического контроля сырья, оборудования, производственных помещений и готовой продукции. В этой связи представляется необходимым усвоение учебной дисциплины «Технология продуктов брожения» при подготовке студентов по специальности 7-07-0711-02 «Промышленная биотехнология».

Целью данного издания является закрепление студентами теоретических знаний, получаемых при изучении курса «Технологии продуктов брожения». Пособие составлено в соответствии с учебными планами подготовки студентов специальности 7-07-0711-02 «Промышленная биотехнология» и включает методики для практического освоения учебной программы в полном объеме.

Лабораторный практикум состоит из разделов, содержащих информацию об отдельных видах брожения: спиртовом, молочнокислом, уксуснокислом, лимоннокислом, пропионовокислом. В каждом разделе представлен теоретический материал и лабораторные работы, которые, в свою очередь, включают цель работы, необходимый перечень реактивов и оборудования, описание методики выполнения, вопросы для самоконтроля.

Данное издание также содержит справочный материал, необходимый для анализа полученных данных при выполнении лабораторных работ.

Лабораторные работы помогут студентам закрепить теоретический материал и приобрести практические навыки, необходимые для анализа сырья, полупродуктов и готовых продуктов брожения; усвоить основы безопасного проведения анализов и научиться планированию и выполнению экспериментов, а также обработке полученных результатов.

При освоении материала студенты должны опираться на знания, приобретенные при изучении дисциплин «Микробиология» и «Биохимия».

Перед началом выполнения экспериментов необходимо ознакомиться с правилами охраны труда, техники безопасности и противопожарной профилактики в лаборатории, а также освоить методику выполнения лабораторной работы.

В отчете о выполнении лабораторной работы должна содержаться следующая информация: название работы и ее цель, краткое описание выполнения эксперимента и полученные результаты с необходимыми пояснениями и расчетами, сформулированные выводы.

ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

При работе в химической лаборатории студенты должны знать и выполнять все правила техники безопасности, соблюдать чистоту, быть внимательными и точно проводить опыты.

Получают допуск к лабораторным работам после прохождения инструктажа и обучения правилам техники безопасности, в том числе пожарной безопасности, которые осуществляет преподаватель, ведущий занятия.

Самостоятельно проводить какие-либо опыты с химическими реактивами, не предусмотренные в описании лабораторной работы, категорически запрещено!

Приступая к работе, студентам необходимо изучить методику выполнения лабораторной работы, правила ее безопасного выполнения, проверить соответствие взятых реактивов тем, которые указаны в методике. Опыт нужно проводить в точном соответствии с его описанием в методических указаниях, особенно придерживаясь очередности добавления реактивов.

Для выполнения опыта важно использовать только чистую лабораторную посуду. Если в ходе опыта требуется нагревание реакционной смеси, надо следовать предусмотренным методическим указаниям способа нагрева: на водяной бане, электроплитке или газовой горелке и др.

Сильно летучие горючие вещества опасно нагревать на открытом огне. Пролитые на пол и стол химические реагенты необходимо обезвредить и убрать под руководством лаборанта (преподавателя) в соответствии с правилами.

При работе в лаборатории нужно соблюдать следующие требования: выполнять работу аккуратно, добросовестно, внимательно, экономно, быть наблюдательным, рационально и правильно использовать время, отведенное для работы, внимательно следить за ходом опытов и замечать все изменения. Запись наблюдений делается сразу же после опыта в лабораторном журнале в соответствии с формой протокола.

По завершению работы следует привести в порядок свое рабочее место: вымыть посуду, протереть поверхность лабораторного стола, закрыть водопроводные краны, выключить электрические приборы.

Правила техники безопасности в лаборатории при работе с микроорганизмами

Работа с микроорганизмами требует строгого соблюдения правил безопасности и личной гигиены. Выделяют следующие правила работы в микробиологической лаборатории:

1. Студенты приступают к работе только с разрешения преподавателя и всю работу проводят в строгом соответствии с изучаемой методикой.

2. В лаборатории допускается работать только в специальном халате, удобной обуви и при необходимости в перчатках. Волосы должны быть заплетены или прибраны в гладкую прическу.

3. В рабочих помещениях лаборатории запрещается курить, принимать пищу, ходить без надобности между столами и открывать форточки, чтобы не допускать циркуляцию микроорганизмов с током воздуха. Принесенные в лабораторию личные вещи (портфели, сумки и т. п.) складывают в специально отведенном месте.

4. На рабочем месте размещают только оборудование, необходимое для выполнения конкретной работы.

5. При использовании спиртовок нужно следить за их герметичностью, не вынимать фитиль из горящей спиртовки, не зажигать одну спиртовку от другой, не пользоваться спиртовкой вблизи легковоспламеняющихся жидкостей. Не оставлять без надобности горящую спиртовку, пламя гасить только колпачком.

6. Во избежание инфицирования рук работать только бактериологической петлей и пинцетом. Использованные инструменты и предметы необходимо прожигать над пламенем спиртовки или помещать в дезинфицирующий раствор.

7. Если в процессе работы инфицированный материал попал на кожу, слизистую оболочку глаз либо в рот, требуется срочно поставить в известность преподавателя и при его непосредственном участии принять необходимые меры по обеззараживанию.

8. При попадании на поверхность стола капель раствора, содержащих микроорганизмы, необходимо воспользоваться ватным тампоном, смочить его в 70%-ном этиловом спирте или в 3%-ном водном растворе хлорамина и обработать инфицированные места. Лучше всего эту работу выполнить под контролем преподавателя.

9. Мазки исследуемых микроорганизмов нужно фиксировать над пламенем горелки или в фиксирующем растворе.

10. Отбор пробы исследуемого материала необходимо производить с помощью автоматического пипет-дозатора. При использовании стеклянных мерных пипеток отбор пробы нужно выполнять с применением резиновой груши.

11. Во время работы нельзя класть на стол стерильные и использованные инструменты, пипетки, ватные пробки, предметные и покровные стекла.

12. Все засеянные пробирки и чашки инкубируют в термостате на протяжении необходимого времени. Для хранения посевы помещают в лабораторный холодильник.

13. Использованные при лабораторных исследованиях предметные стекла, пипетки, шпатели сразу моют и при необходимости кипятят. Отработанные чашки Петри и пробирки с посевами микроорганизмов собирают в биксы и передают лаборанту для автоклавирования. Отработанный материал и ненужные культуры подлежат обязательному уничтожению, желательно в тот же день.

14. В конце работы необходимо привести в порядок рабочее место, протереть стол ватным диском, смоченным в этиловом спирте, и обязательно вымыть руки.

Правила техники безопасности в лаборатории при работе с химической посудой

Основными травмирующими факторами, которые связаны с использованием стеклянной посуды, аппаратов и приборов, являются острые осколки стекла, способные вызвать порезы тела работающего, а также ожоги рук при неосторожном обращении с нагретыми до высокой температуры частями стеклянной посуды. Основные правила работы с химической посудой приведены ниже:

1. Размешивать реакционную смесь в сосуде стеклянной палочкой или шпателем надо осторожно, не допуская повреждения сосуда.

2. Перенося сосуды с горячей жидкостью, надо держать их двумя руками: одной – за дно, другой – за горловину, используя при этом полотенце либо «прихватки» (во избежание ожогов кистей и пальцев рук).

3. При закрывании пробкой толстостенной посуды следует держать ее за верхнюю часть горловины. Нагретый сосуд нельзя закрывать притертой пробкой до тех пор, пока он не охладится. В опытах

с нагревом необходимо пользоваться посудой, имеющей соответствующую маркировку.

4. Если посуда из стекла разбилась, сразу необходимо сообщить об этом лаборанту и преподавателю, не трогать осколки стекла руками, аккуратно собрать их с помощью инвентаря и выбросить в специальное место для битой стеклянной посуды.

5. В случае пореза стеклом нужно сначала внимательно осмотреть рану и извлечь из нее осколки стекла, если они есть, а затем промыть поврежденное место 2%-ным раствором перманганата калия, смазать йодом и завязать бинтом либо заклеить лейкопластырем.

Правила техники безопасности в лаборатории при работе с электрооборудованием и электроприборами

Химические лаборатории (включая биохимические и микробиологические) согласно степени опасности поражения электрическим током относятся к помещениям с повышенной или особой опасностью, которая обусловлена возможностью воздействия на электрооборудование химически активных сред. Все работы, связанные с применением электроприборов, должны проходить под наблюдением преподавателя (лаборанта).

Выделяют следующие правила работы с электрооборудованием и электроприборами:

1. При работе с водяной баней нельзя оценивать степень нагрева воды рукой.

2. Использовать неисправные электроприборы строго запрещается. При выявлении неисправности оборудования либо компонентов электросети следует обратиться к преподавателю. Чинить самостоятельно приборы запрещается.

3. При поражении электрическим током, если пострадавший остается в соприкосновении с токоведущими частями, необходимо немедленно выключить ток с помощью пускателя, или вывернуть охранную пробку, или перерубить токопроводящий провод изолированным инструментом. К пострадавшему нельзя прикасаться незащищенными руками (без резиновых перчаток). Если пострадавший потерял сознание, после выключения тока нужно немедленно, не дожидаясь врача, приступить к выполнению сердечно-легочной реанимации.

Правила техники безопасности в лаборатории при работе с реактивами

Если к работе не дано указаний относительно дозировки реактивов, то брать их для выполнения опытов необходимо в возможно меньшем количестве (экономия материалов и времени, которое затрачивается на опыт).

Выделяют следующие правила работы с реактивами:

1. Избыток реактива нельзя высыпать и выливать обратно в сосуд, из которого он был взят.

2. Все склянки с растворами следует держать закрытыми и открывать их только на время применения; закрывая склянки, не путать пробки во избежание загрязнения реактивов.

3. После расходования реактива банку или стакан необходимо сразу закрыть пробкой и поставить на место.

4. Сухие реактивы следует брать с помощью лопаток, пластмассовых или металлических шпателей. Шпатель должен быть всегда сухим и чистым. После использования нужно его тщательно обтереть.

5. В случаях, когда реактив отбирается пипеткой, ни в коем случае нельзя той же пипеткой брать реактив из другой емкости.

6. При наливании реактивов запрещается наклоняться над сосудом во избежание попадания брызг на лицо или одежду.

7. Нельзя держать на весу банку или стакан с реактивом, которые нужно открыть, их следует поставить на лабораторный стол и только после этого открывать.

Раздел 1

СПИРТОВОЕ БРОЖЕНИЕ

1.1. Получение этилового спирта из крахмалосодержащего сырья

Исторически первым было изучено спиртовое брожение у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae.* Дрожжи, как и большинство микроскопических грибов, осуществляют аэробное дыхание, однако в отсутствии кислорода они способны сбраживать углеводы до этилового спирта и углекислого газа. Небольшое количество спирта могут образовывать некоторые плесневые грибы (аспергиллы, мукоровые) и бактерии, но у данных микроорганизмов спиртовое брожение проходит с образованием большого количества побочных продуктов.

Спиртовое брожение представляет собой сложный многоступенчатый процесс превращения глюкозы в спирт и углекислый газ, идущий по фруктозодифосфатному пути (гликолитический путь Эмбдена – Мейергофа – Парнаса) с промежуточным образованием пировиноградной кислоты. При этом основными побочными продуктами спиртового брожения являются глицерин, высшие (сивушные) спирты, органические кислоты (уксусная, пировиноградная, молочная, янтарная) и альдегиды.

При спиртовом брожении субстрат расходуется на образование различных веществ в следующем количестве: этанол – 46–47%, диоксид углерода – 44–46%, биомасса дрожжей – 1,8–4,0%, глицерин – 3–4%, высшие спирты – 0,3–0,7%, органические кислоты – 0,2–1,0%, альдегиды – 0,1–0,2%.

Химизм спиртового брожения приведен на рис. 1.1. В осуществлении спиртового брожения участвуют следующие ферменты: Ф1 – гексокиназа; Ф2 – глюкозофосфатизомераза; Ф3 – фосфофруктокиназа; Ф4 – фруктозо-1,6-дифосфатальдолаза; Ф5 – триозофосфатизомераза; Ф6 – 3-фосфоглицеральдегид дегидрогеназа; Ф7 – фосфоглицераткиназа; Ф8 – фосфоглицеромутаза; Ф9 – енолаза; Ф10 – пируваткиназа; Ф11 – пируватдекарбоксилаза; Ф12 – алкогольдегидрогеназа; Ф13 – глицерол-3-фосфатдегидрогеназа; Ф14 – глицеролфосфатаза.

Оптимально брожение протекает в кислой среде при уровне pH 4,0–5,0. В этих условиях глицерин накапливается в количестве не более 2%, но изменение pH среды в щелочную сторону (pH около 8) позволяет получать до 40% глицерина по отношению к сброженному сахару.

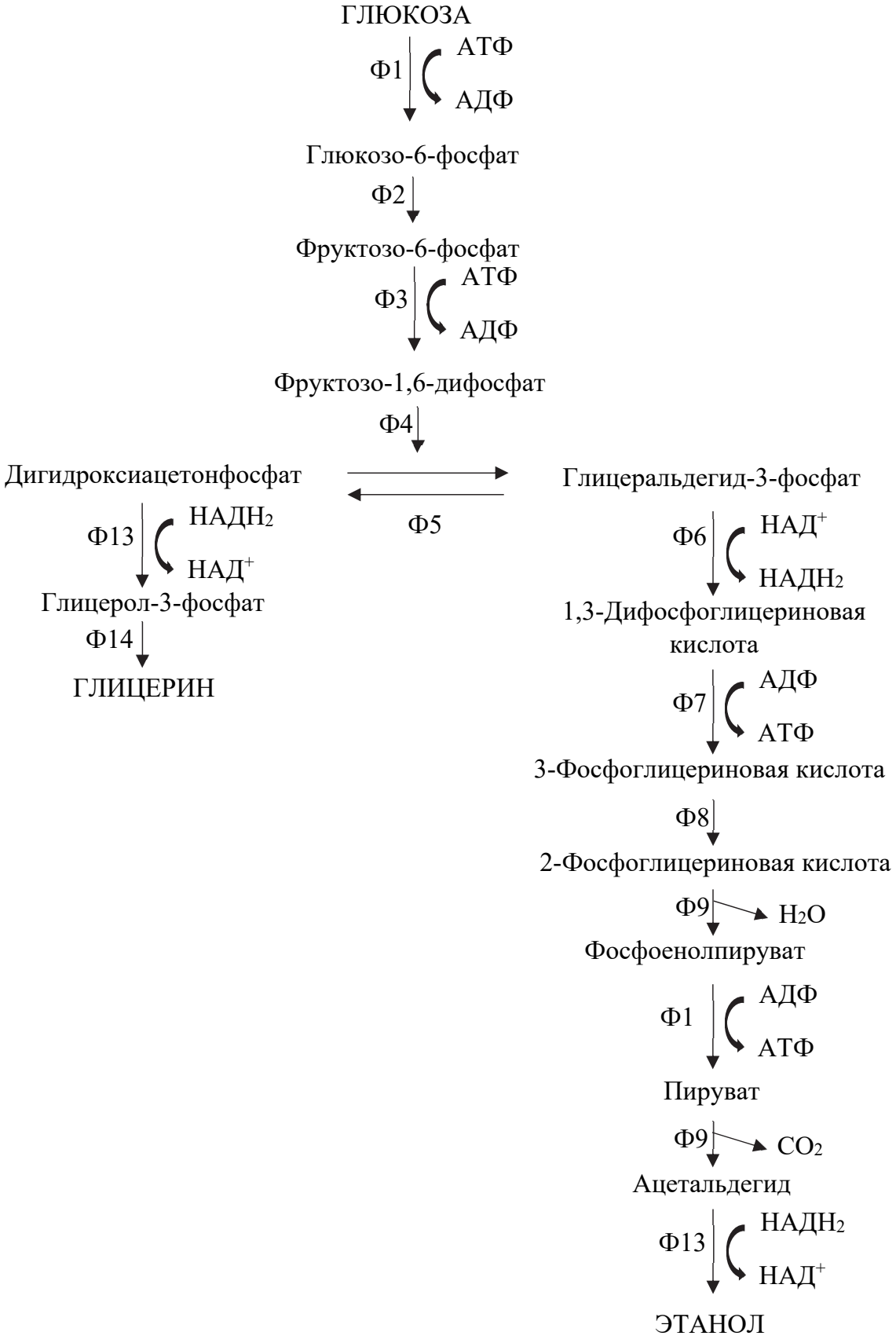


Рис. 1.1. Схема спиртового брожения

Оптимальная концентрация сахара в среде составляет 10–15%, при содержании сахара около 30% брожение уже прекращается. Однако в природе встречаются дрожжи, которые могут сбраживать и 60%-ные сахаросодержащие субстраты.

Наиболее благоприятной температурой для спиртового брожения является 30°С. При пониженных температурах брожение замедляется, но полностью не прекращается даже при температуре немного ниже 0°С. При 50°С брожение уже не протекает, так как дрожжи погибают.

Этиловый спирт, накапливающийся в процессе брожения, отрицательно влияет на дрожжи. В основном брожение прекращается при накоплении в среде около 12% спирта. Однако в настоящее время выделены спиртоустойчивые расы дрожжей, способные продуцировать при 20%-ном содержании спирта.

Процесс спиртового брожения лежит в основе многих пищевых производств: производство этилового спирта, глицерина, виноделие, пивоварение, хлебопечение.

В зависимости от исходного сырья с помощью спиртового брожения получают пищевой и технический этиловый спирт. Пищевой спирт, который применяется при производстве продуктов питания, производят из сахаросодержащего (меласса) и крахмалосодержащего (картофель, зерна злаков, отходы крахмалопаточных заводов) сырья. При использовании крахмалосодержащего сырья его предварительно осахаривают (гидролиз крахмала до сбраживаемых дрожжами сахаров – получение гидролизного сусла). Для производства технического спирта применяют гидролизаты древесины и отходы целлюлозно-бумажной промышленности.

В гидролизно-спиртовом производстве сбраживание углеводов гидролизата чаще всего осуществляют дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* (выход этанола 55−57 дм^3 из 100 кг сброженных сахаров) или *Schizosaccharomyces pombe* (57−59 дм^3 из 100 кг сахаров). Оптимальная температура брожения при использовании сахаромицетов составляет 29–30°С, для шизосахаромицетов – 34–36°С. Для ограничения развития бактериальных культур гидролизное сусло сбраживают при величине pH 4,0−4,2. Из-за высокой чувствительности к ингибирующим соединениям гидролизата конструктивный обмен веществ у шизосахаромицетов сильно угнетен, что и обусловливает их большую спиртообразующую способность. По окончании процесса брожения дрожжи отделяют, спирт отгоняют на перегонных аппаратах и получают

спирт-сырец и барду. Барда представляет собой отход спиртового производства, очень богатый по составу. Спирт-сырец является сырьем для производства спирта-ректификата (специальным образом очищенного) или используется для технических целей. Отработанные дрожжи выпускают в виде жидких и сухих кормовых препаратов, а также прессованных (пекарских).

Одной из проблем в процессе брожения является то, что вместе с производственными дрожжами могут развиваться дикие дрожжи, попавшие из окружающей среды. Большинство диких дрожжей не способны к спиртовому брожению или вырабатывают очень мало спирта, однако используют питательные вещества среды и угнетают развитие производственных дрожжей, что приводит к снижению выхода спирта.

В настоящее время осуществляется интенсивный поиск нетрадиционных микроорганизмов-продуцентов этилового спирта, способных сбраживать широкий круг субстратов, имеющих высокую продуктивность, обладающих повышенной устойчивостью к этиловому спирту и высокой температуре. Представляют интерес этанолсинтезирующие бактерии. Например, бактерии *Zymomonas mobilis* отличаются от дрожжей интенсивным метаболизмом: имеют высокую удельную скорость конверсии глюкозы в этанол, обеспечивают более высокий выход спирта (до 95% от теоретического) и более толерантны к нему. Но эти бактерии чувствительны к присутствию в питательных средах ингибиторов (фурфурола, фенолов) и требуют осуществления процесса брожения в строгих условиях асептики. Термофильные бактерии *Clostridium thermocellum* (оптимальная температура роста 68°С) способны превращать целлюлозу растительного сырья в этанол, но при этом сырье должно быть освобождено от лигнина. Достичь высокого выхода спирта при прямой конверсии растительного сырья пока не удается. Также получены штаммы дрожжей, способные сбраживать пентозные сахара (*Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis*, *Candida shehata*), выход этанола при этом достигает 35−47 дм^3 из 100 кг ксилозы.

В качестве крахмалосодержащего сырья в производстве этанола используют пшеницу, реже картофель (крахмалистость пшеницы составляет 52%, картофеля − 16−18%). Выход спирта из 1 т крахмала – 65,5−65,6 дал (декалитров абсолютного алкоголя).

Традиционные продуценты этанола не способны к расщеплению полисахаридов, поэтому, как было указано выше, при получении

сусла крахмалосодержащее сырье подлежит разваривaнию и осахариванию. Измельченное крахмалосодержащее сырье разваривают в варочных колоннах в одну или в две ступени при температуре 132–135°С (пшеница) либо 150°С (картофель). Растворенный при разваривании зерна или картофеля крахмал осахаривают амилолитическими ферментами зернового солода или культур микроорганизмов, преимущественно мицелиальных грибов и бактерий. Из растительных материалов наиболее богато амилолитическими ферментами пророщенное зерно злаков, называемое солодом. За рубежом в спиртовой отрасли промышленности широко применяют ферментные препараты на основе культур мицелиальных грибов, которые имеют ряд преимуществ по сравнению с солодом: культуры мицелиальных грибов выращивают на пшеничных отрубях или кукурузной муке, тогда как для получения солода требуется зерно определенной влажности; с солодом в сусло вносятся в большом количестве посторонние микроорганизмы, что отрицательно сказывается на выходе этанола; грибы образуют комплекс ферментов, которые глубже гидролизуют крахмал, а также расщепляют гемицеллюлозы до моносахаридов, что повышает выход этанола из сырья.

В процессе осахаривания крахмалосодержащего сырья участвуют различные ферменты. Наибольшее производственное значение имеют амилазы: α- и β-амилазы катализируют разрыв только α-1,4-глюкозидных связей. Под действием α-амилаз связи разрываются беспорядочно, но преимущественно внутри цепей. В результате образуются главным образом декстрины, небольшое количество мальтозы и олигосахаридов. В зависимости от характера действия α-амилазу называют эндогенной или декстриногенной амилазой.

Действие β-амилазы направлено на концевые (внешние) связи в крахмале, при этом последовательно, начиная с нередуцирующих концов цепей, отщепляется по два остатка глюкозы (мальтоза). Амилоза практически полностью превращается β-амилазой в мальтозу, амилопектин – только на 50–55%.

В результате совместного действия α- и β-амилаз образуется смесь сахаридов, состоящая из мальтозы, небольшого количества глюкозы и низкомолекулярных декстринов, в которых сосредоточены все α-1,6-глюкозидные связи крахмала.

В бактериях и микроскопических грибах отсутствует β-амилаза, но содержится активная α-амилаза, отличающаяся композицией аминокислот в белке и специфичностью действия. В частности, при катализе

α-амилазой микроскопических грибов образуется большое количество глюкозы и мальтозы. Среди бактериальных амилаз имеются как сахарогенные, так и декстриногенные. Первые гидролизуют крахмал на 60% и более, вторые – на 30–40%. Амилазы микробного происхождения, как и амилазы солода, не атакуют α-1,6-глюкозидные связи.

Известны три вероятных способа взаимодействия фермента с субстратом (содержащим большое количество цепей): многоцепочный, одноцепочный и комбинированный.

По многоцепочному способу молекула фермента в случайном порядке атакует одну из полисахаридных цепей, отщепляя от нее звено, а затем также в случайном порядке атакует следующие цепи, в том числе, возможно, и атакованную ранее. Таким образом, за время существования фермент-субстратного комплекса происходит только один каталитический акт.

При одноцепочном способе молекула фермента, атаковав в случайном порядке одну из полисахаридных цепей, последовательно отщепляет от нее звенья до полного расщепления цепи. За время существования фермент-субстратного комплекса гидролизуются все доступные для фермента связи.

Комбинированный способ, или способ множественной атаки, заключается в том, что за время существования фермент-субстратного комплекса гидролизуется несколько связей. При этом после отщепления одного звена фермент не отталкивается, а задерживается. Атака происходит с чередованием одно- и многоцепочного способов.

На отечественных спиртовых заводах для осахаривания крахмала применяют сырцовый (несушенный) солод в виде солодового молока, ферментные препараты (глюкаваморин, амилоризин, амилосубтилин) различного уровня активности или смесь солодового молока и ферментного препарата.

Технология получения солода включает следующие основные процессы: замачивание сырья с достижением влажности 38–40%; проращивание зерна в течение 10 сут в пневматической солодовне в слое толщиной 0,5–0,8 м; измельчение солода в дисковых или молотковых дробилках; дезинфекция солода формалином или раствором хлорной извести и приготовление солодового молока. Солодовое молоко получают смешиванием измельченного солода с водой (4–5 $дм^3$ воды на 1 кг солода). Чаще всего готовят смесь из трех видов солода: ячменного (50%), просяного (25%) и овсяного (25%). Запрещается использовать солод из одной культуры при производстве этилового спирта из той же культуры.

Разваренную массу сырья осахаривают при температуре 58–60°С с перемешиванием в течение 20 мин в присутствии осахаривающего агента. Осахаривание продолжается при сбраживании сусла в бродильных аппаратах. Концентрация сусла должна быть на уровне 16–18% по сахарометру. Перед подачей в бродильный аппарат сусло охлаждают до температуры «складки» (20–22°С) с целью угнетения развития посторонних микроорганизмов, пока концентрация дрожжей в сусле невелика.

В настоящее время актуальным является поиск дрожжей, способных не только ферментировать моносахариды, но и синтезировать амилолитические ферменты, гидролизующие крахмал. Амилолитическая способность обнаружена у дрожжей *Schwanniomyces castellii*, которые образуют α-амилазу и две амилоглюкозидазы, гидролизующие α-1,6-связи и концевые α-1,4-связи с образованием глюкозы. Для усиления амилолитической активности дрожжей применяют методы генетической инженерии.

При производстве этанола поступающее на сбраживание гидролизное сусло должно содержать 60−80 мг/дм^3 азота и 40−50 мг/дм^3 фосфора в пересчете на P_2O_5. Недопустима высокая (более 800 мг/дм^3) концентрация азота в сусле, которая резко снижает спиртообразующую способность дрожжей.

В производственных условиях сусло сбраживают при температуре 28–30°С и pH 4,8–5,0 периодическим или непрерывным методом. Продолжительность периодического процесса брожения составляет около 3 сут. Бродильные аппараты должны быть оборудованы устройствами для отвода выделяющегося биологического тепла (змеевики, водяная рубашка). Во время главного брожения поддерживают температуру 29–30°С, в процессе дображивания – 27–28°С. Для засева сусла в бродильных аппаратах используют дрожжи, выращенные в дрожжанках по методу естественно чистой культуры, т. е. в условиях ограничения роста посторонних микроорганизмов снижением активной кислотности среды до pH 3,8–4,0 с помощью серной или молочной кислоты. Количество суспензии засевных дрожжей составляет 10–12% от объема сусла. Брожение считают законченным, когда содержание несброженных сахаров (редуцирующих веществ) в бражке достигает 0,2–0,3%, а количество сухих веществ (по сахарометру) не изменяется в течение последних 2–3 ч. Концентрация спирта в бражке, как правило, составляет 8–11% об.

Непрерывный способ брожения сложнее осуществить в промышленных масштабах из-за инфицирования зерно-картофельного сусла посторонними микроорганизмами, что вызывает значительное увеличение

кислотности ферментационной среды, инактивацию амилолитических ферментов и снижение выхода этанола. Непрерывный процесс реализуется только в батарее из четырех и более аппаратов. На практике используют бродильные батареи из восьми аппаратов (два головных и шесть дображивающих). Непрерывный приток сусла в батарею переключается с первого на второй головной аппарат, и в него же перекачивается содержимое первого головного аппарата, который затем моют, стерилизуют паром, охлаждают, заполняют, восстанавливая приток свежего сусла, и засевают дрожжами. Пока первый головной аппарат заполняется, содержимое второго перекачивают в третий аппарат, а второй моют, стерилизуют и наполняют перетоком из первого аппарата. По такому принципу осуществляют последовательную стерилизацию всех аппаратов батареи.

Выделение спирта из бражки и его очистку проводят на трех- или четырехколонных ректификационных установках непрерывного действия.

Лабораторная работа № 1
СБРАЖИВАНИЕ В ЭТИЛОВЫЙ СПИРТ КРАХМАЛОСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ

Цель работы: ознакомиться с технологией сбраживания крахмалосодержащих сред и определить выход этилового спирта в зависимости от крахмалистости сырья и вида осахаривающего материала.

Реактивы, материалы и оборудование: крахмалосодержащее сырье (рожь, пшеница, ячмень, овес, просо, картофель), формалин или хлорамин, сухие хлебопекарные дрожжи, колба вместимостью 500 $см^3$, цилиндр, ареометр Баллинга, биореактор с гидрозатвором, термостат, роторный испаритель, ареометр для спирта.

Порядок выполнения работы. 1. Приготовление осахаривающего материала. 2. Подготовка сырья к осахариванию. 3. Осахаривание и сбраживание массы. 4. Анализ бражки.

1. Приготовление осахаривающего материала

Для приготовления солода используют зерно ячменя, овса и проса в соотношении 2 : 1 : 1. Количество солода должно составлять 15,5% от массы крахмала, включая крахмал солода. Содержание крахмала в различных видах сырья приведено в табл. 1.1.

Таблица 1.1

Содержание крахмала в сырье

Сырье	Средняя крахмалистость, % от сухого вещества
Рожь	50
Пшеница	52
Ячмень	49
Овес	37
Просо	51
Картофель	75

Пример для расчета количества солода. Для получения сусла взято 200 г пшеницы, средняя крахмалистость которой около 52%. Средняя крахмалистость солода, приготовленного из ячменя, овса и проса, составляет 47%. Уравнение для расчета количества солода имеет следующий вид:

$$\frac{x}{200 \cdot 0,52 + x \cdot 0,47} = 0,155,$$

где x – необходимое количество солода, г.

Навески зерна, предназначенного для получения солода, смешивают, промывают водой, помещают в чашку Петри и замачивают. Вода для замачивания должна иметь температуру 18–20°С и полностью покрывать поверхность зерна. Длительность замачивания – 18 ч. Затем воду сливают, поверх зерна кладут влажную салфетку, чашку закрывают и оставляют на 7–10 сут для солодоращения. При необходимости салфетку увлажняют.

Солод промывают водой, обрабатывают антисептиком − формалином (0,2 $см^3/дм^3$) или хлорамином с выдержкой в течение 20 мин. Затем раствор антисептика сливают и измельчают солод в дезинтеграторе. Для получения солодового молока измельченный солод смешивают с водой из расчета 4−5 $см^3$ воды на 1 г солода.

Для осахаривания сырья можно использовать ферментные препараты, полученные путем поверхностного или глубинного культивирования гриба *Aspergillus awamori*. В соответствии с указанием преподавателя используется или сама культура, или ферментная вытяжка из нее с известной амилолитической активностью. Количество препарата должно обеспечить активность фермента в осахариваемом материале 10,0–12,5 ед./$см^3$.

2. Подготовка сырья к осахариванию

В качестве крахмалосодержащего сырья применяют рожь, пшеницу, ячмень, овес, просо, картофель. Измельченное зерно смешивают с теплой (40°С) водой в соотношении 1,0 : 2,5–3,0 в колбе вместимостью 500 см^3. Количество зерна берут с таким расчетом, чтобы получить 200 см^3 среды. Приготовленную смесь разваривают в автоклаве при температуре 130–132°С в течение 1 ч.

3. Осахаривание и сбраживание массы

Разваренную массу охлаждают до температуры 60°С, смешивают с осахаривающим агентом и выдерживают в течение 20 мин. Сусло охлаждают до температуры 28°С и определяют ареометром Баллинга (сахарометр) содержание в нем сахаров. Для этого берут навеску полученной массы, разводят ее водой в 3–5 раз (до объема не менее 250 см^3) и фильтруют. Затем в стеклянный цилиндр вливают фильтрат и медленно помещают сахарометр. Когда сахарометр установится, отсчитывают деления, которых достиг уровень жидкости. С учетом разбавления количество сахаров в сусле должно быть не менее 15° по Баллингу.

После в сусло вносят 20 см^3 суспензии спиртообразующих дрожжей с концентрацией 50−70 г/дм^3. Колбу помещают в анаэростат и проводят сбраживание в течение 3 сут при температуре 28–30°С.

4. Анализ бражки

По окончании сбраживания замеряют объем полученной бражки и упаривают этиловый спирт на вакуум-роторном испарителе при температуре 40°С. При этом следят, чтобы не начала испаряться вода (как только в обратном холодильнике появится конденсат, упаривание прекращают). Затем измеряют объем спирта-сырца. С помощью ареометра определяют плотность спиртового раствора при температуре 20°С, после чего по табличным данным (табл. П1) находят концентрацию полученного из бражки этилового спирта в процентах.

Далее рассчитывают концентрацию спирта (c, %) в бражке по формуле

$$c = \frac{V_{\text{с}} \cdot k}{V_{\text{б}}}, \qquad (1.1)$$

где $V_{\text{с}}$ – объем спирта после упаривания бражки, см^3; k – концентрация спирта после упаривания, %; $V_{\text{б}}$ – объем бражки, см^3.

Выход спирта из 1 т условного крахмала (B, дал) рассчитывают по формуле

$$B = \frac{V_б \cdot c}{(m \cdot s_1 + x \cdot s_2) \cdot 10^2}, \quad (1.2)$$

где m – масса крахмалосодержащего сырья, г; s_1 – крахмалистость сырья, %; x – количество солода, г; s_2 – крахмалистость солода, %.

Выход спирта из 1 т сырья ($B_с$, дал) рассчитывают следующим образом:

$$B_с = \frac{V_б \cdot c}{m \cdot 10^4}. \quad (1.3)$$

Полученную барду после упаривания отдают лаборанту и могут использовать для микробиологического синтеза витамина B_{12}.

Вопросы для самоконтроля

1. Приведите краткую схему спиртового брожения.
2. Какие побочные продукты образуются при спиртовом брожении?
3. Какова оптимальная концентрация сахаров для осуществления спиртового брожения?
4. Как влияет температура на эффективность спиртового брожения и при каких показателях данного параметра проводят сбраживание в производственных условиях?
5. Каким образом влияет концентрация накопившегося этилового спирта в ходе брожения на эффективность данного процесса?
6. Перечислите продуценты этилового спирта при его синтезе микробиологическим способом.
7. Назовите стадии получения этилового спирта из крахмалосодержащего сырья.
8. Какие ферменты используются для осахаривания крахмалосодержащего сырья?
9. Приведите известные способы взаимодействия фермента с субстратом.
10. Опишите технологическую схему приготовления солода.
11. Какая цель данной лабораторной работы?
12. Каким образом готовили осахаривающий материал?
13. Как осуществляли подготовку крахмалосодержащего сырья к осахариванию?
14. Каким образом проводили осахаривание и сбраживание сусла?
15. Как определяли концентрацию этилового спирта в полученной бражке?

1.2. Переработка молочной сыворотки для получения этилового спирта

Молочная сыворотка – ценное пищевое сырье, включающее все компоненты молока – одного из самых полезных пищевых продуктов (табл. 1.2), представляет собой светло-желтую слегка тягучую жидкость с солоновато-кислым вкусом. Полностью все составные части молока используются лишь при получении цельномолочных продуктов (пастеризованное и стерилизованное молоко, кисломолочные напитки).

При производстве творога и сыров в готовый продукт переходит только половина сухих веществ, содержащихся в молоке, другая половина остается в сыворотке. Энергетическая ценность сыворотки составляет 36% энергетической ценности молока, однако биологическая ценность примерно такая же.

Таблица 1.2

Основные показатели молочной сыворотки

Показатель	Молочная сыворотка		
	подсырная	творожная	казеиновая
Содержание сухих веществ, %	4,5–7,2	4,2–7,4	4,5–7,5
В том числе: лактоза	3,9–4,9	3,2–5,1	3,5–5,2
минеральные вещества	0,3–0,8	0,5–0,8	0,3–0,9
молочный жир	0,2–0,5	0,05–0,4	0,02–0,1
Кислотность, °Т	15,0–20,0	50,0–85,0	50,0–120,0
Плотность, кг/м^3	1018,0–1027,0	1019,0–1026,0	1020,0–1025,0

Состав углеводов молочной сыворотки аналогичен составу углеводов молока: моносахариды (глюкоза, галактоза и др.), их производные; дисахарид – лактоза и более сложные олигосахариды.

В сыворотку практически полностью переходят сывороточные белки молока (α-лактальбумин, β-лактоглобулин, иммуноглобулины), есть незначительное количество казеина в виде частиц размером менее 1 мм, образующиеся при дроблении сырного зерна, в следовых количествах присутствуют ферменты.

Молочный жир в сыворотке находится в более диспергированном состоянии, чем в молоке, что положительно влияет на его усвояемость. Содержание жира зависит от вида вырабатываемого молочного продукта, исходного сырья и режимов технологического процесса.

Минеральные вещества сыворотки находятся в растворимом, коллоидном и нерастворимом состоянии. Из катионов преобладают K^+, Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}. Из органических кислот присутствуют молочная, лимонная и летучие кислоты – уксусная, муравьиная, пропионовая, масляная. В молочную сыворотку из молока в большей степени переходят водорастворимые, а не жирорастворимые витамины. Специфический желтовато-зеленый цвет сыворотки обусловлен наличием рибофлавина, однако при хранении сыворотки его содержание снижается.

Количество молочной сыворотки составляет около 80% молока, перерабатываемого при получении творога, сыра и казеина. Только в Республике Беларусь ежегодно образуется около 2 млн т молочной сыворотки, около 60% от этого объема приходится на подсырную сыворотку, 25% – творожную, 15% – казеиновую.

Переработка сыворотки в настоящее время (на 2023 г.) в Беларуси не превышает 25% от общего объема. Сыворотка в натуральном виде в количестве 45–50% направляется на корм сельскохозяйственных животных. Однако ее возврат в хозяйства экономически невыгоден, поскольку приходится транспортировать жидкий продукт с низким содержанием сухих веществ. Поэтому наиболее распространенным способом переработки сыворотки считается сушка и последующее использование в качестве кормовой добавки.

В настоящее время можно выделить четыре основных направления применения молочной сыворотки: использование в натуральном виде, переработка и применение в виде концентратов, выделение и использование наиболее ценных компонентов, биотехнологическая переработка.

Для более рационального использования сыворотки из нее извлекают молочный жир, комплекс белков или их отдельные фракции, лактозу и минеральные соли.

Для разделения сыворотки на составляющие ее компоненты применяются различные методы молекулярно-ситовой фильтрации: ультрафильтрация, гельфильтрация, ионный обмен и электродиализ (деминерализация сыворотки).

Белковые массы из молочной сыворотки используют для повышения биологической ценности других продуктов. За рубежом эта технология отработана и реализована как часть технологии производства заменителей жира – сывороточный белок вырабатывается в виде мельчайших круглых шариков, по консистенции напоминающих кулинарный жир, который включается в различные замороженные десерты, мороженое, йогурты, пастообразные сыры.

Оригинальным направлением является физико-химическая обработка молочной сыворотки и ее компонентов с целью получения их производных: конверсия лактозы в лактулозу, гидролиз лактозы до моносахаридов и других продуктов.

На базе РУП «Институт мясо-молочной промышленности» разработана технология получения из сыворотки молочного сахара с последующим производством из него лактулозы. На ОАО «Городской молочный завод № 2» г. Минска начали производить лактулозу из молочного сахара-сырца, выделенного из молочной сыворотки с использованием электродиализной установки регулирования минерального состава конечного продукта и очистки его от продуктов, образующихся после процесса изомеризации, что позволяет получать лактулозу высокого пищевого и фармацевтического качества.

Деминерализованная молочная сыворотка (сгущенная и сухая) лишена солоноватого вкуса и повышенной кислотности, что позволяет более широко использовать ее в пищевой промышленности, при этом удельный вес затрат на технологический процесс деминерализации составляет 4% от себестоимости продукции. Например, деминерализованная до уровня 90% молочная сыворотка широко применяется при производстве детского питания и заменителей женского молока, так как имеет сбалансированный состав по лактозе, сывороточным белкам и минералам.

При биотехнологической переработке сыворотки выделяют следующие основные направления:

– синтез белковых веществ дрожжами, использующими для роста и развития лактозу;

– гидролиз лактозы ферментами до более сладких моносахаридов (глюкозы и галактозы);

– микробный синтез витаминов, жира, ферментов и антибиотиков;

– переработка лактозы в молочную кислоту и этиловый спирт;

– расщепление молочных белков до свободных аминокислот.

В качестве продуцентов в биотехнологических процессах получения различных пищевых и кормовых продуктов из молочной сыворотки могут служить разнообразные представители аэробных и анаэробных микроорганизмов, обладающих одним общим для них свойством – способностью утилизировать лактозу. Микроорганизмы, используемые для биотехнологической переработки молочной сыворотки, приведены в табл. 1.3.

При оптимальных условиях культивирования некоторые штаммы дрожжей дают более 40 г биомассы из 1 дм^3 сыворотки. Культуральная жидкость, полученная в результате выращивания дрожжей на сыворотке, по составу приближается к обезжиренному молоку и значительно превосходит исходную сыворотку по содержанию белка и биологически активных веществ.

Таблица 1.3

Микроорганизмы, используемые для переработки молочной сыворотки

Продуценты	Продукты
Молочнокислые бактерии	Молочная кислота, лечебно-профилактические пищевые и кормовые продукты, напитки, бакконцентраты, антибиотик низин
Дрожжи	Белково-витаминные кормовые и пищевые препараты, ферменты, жир, рибофлавин, каротиноиды, этанол, лечебно-профилактические и столовые напитки
Пропионовокислые бактерии	Пропионовая кислота, уксусная кислота, витамин B_{12}
Клостридии	Спирты, рибофлавин, масляная кислота
Микроскопические (плесневые) грибы	Белково-витаминные кормовые препараты, ферменты, жир, рибофлавин, каротиноиды, лимонная кислота, антибиотики

Способ производства этилового спирта из молочной сыворотки предусматривает ее очистку от белков, ферментацию лактосбраживающими культурами дрожжей и бактерий, отгонку спирта и ректификацию. Эффективность брожения дрожжей на сыворотке с 4,3% массовой долей лактозы составляла 86,6–94,3% от теоретического. Наиболее эффективно процесс осуществляется при уровне pH 4,0–4,5 и температуре 30–32°С. Теоретический выход спирта из 1 т лактозы при ее брожении составляет 68,2 дал.

Получение активной биомассы дрожжей осуществляется в специальных дрожжерастильных аппаратах (ферментерах), в которых поддерживают регулируемые до определенного уровня pH, температуру и аэрацию. Питательной средой служит депротеинизированная молочная сыворотка, в которую вносят чистую культуру продуцента. В качестве продуцента обычно берут штаммы «молочных дрожжей» (*Debaryomyces hansenii, Kluyveromyces fragilis, Kl. lactis, Kl. marxianus*), их вносят в субстрат в количестве 8–10% от содержания лактозы.

Рост биомассы происходит при температуре 30°С и pH среды 4,5. Полученная таким образом суспензия дрожжей используется в качестве посевного материала для инокуляции (засева) ферментера, в котором производится спиртовое брожение.

При подготовке питательной среды для спиртового брожения сыворотку депротеинизируют, пастеризуют и сгущают. Известно два способа: согласно первому, сыворотку сгущают до 22% массовой доли лактозы, второму – до 15%, но с добавлением послеспиртовой барды, обогащенной низином и молочной кислотой. В последнее время для сгущения сыворотки часто используют не вакуум-выпарные установки, а метод обратного осмоса. После сгущения в сыворотку вносят минеральные соли, устанавливают необходимое значение pH (4,0–4,5) и температуру (30°С).

Брожение осуществляют в емкостях, обеспечивающих ведение процесса в анаэробных условиях, и поддерживают необходимый уровень pH (4,0–5,0) и температуру 30°С.

Отделение дрожжей сепарацией или на пресс-фильтре и дальнейшая дистилляция бражки при получении спирта из сыворотки аналогичны операциям, осуществляемым при изготовлении этанола из других видов сырья.

Побочными продуктами процесса получения спирта являются сывороточные белки, дрожжи, послеспиртовая бражка, а также диоксид углерода, количество которого при переработке 1 т концентрированной до 15% лактозы сыворотки может составлять более 60 кг.

Лабораторная работа № 2
СБРАЖИВАНИЕ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЭТИЛОВОГО СПИРТА

Цель работы: освоить методы подготовки молочной сыворотки к биотехнологической переработке; смоделировать производственный процесс сбраживания сыворотки в этанол и определить его выход.

Реактивы, материалы и оборудование: молочная сыворотка, 2%-ная серная кислота, растворы I и II для определения редуцирующих веществ, глюкоза, молочные дрожжи, двухзамещенный фосфорнокислый аммоний, двухзамещенный фосфорнокислый калий, мочевина, хлористый магний, колбы вместимостью 100 $см^3$, цилиндр, биореакторы с гидрозатвором, эбулиостат, бюретка, центрифуга, термостат.

Порядок выполнения работы. 1. Подготовка молочной сыворотки. 2. Определение содержания углеводов в сыворотке. 3. Подготовка посевного материала. 4. Сбраживание углеводов сыворотки в этанол. 5. Анализ бражки.

1. Подготовка молочной сыворотки

Берут 250 $см^3$ сыворотки, подогревают ее до температуры 45°С и отделяют жир методом центрифугирования в течение 15 мин при 5000 $мин^{-1}$. Далее обезжиренную сыворотку подогревают до 95°С, выдерживают при данной температуре 15 мин с целью коагуляции белков и снова центрифугируют при тех же параметрах. Подготовленную сыворотку разливают по 50 $см^3$ в 4 колбы объемом 100 $см^3$.

2. Определение содержания углеводов в сыворотке

Берут 50 $см^3$ (первая колба) подготовленной молочной сыворотки и устанавливают исходное содержание углеводов. В сыворотке углеводы представлены в основном дисахаридом лактозой. Поэтому сначала проводят гидролиз: к 50 $см^3$ сыворотки добавляют 5 $см^3$ 2%-ного раствора серной кислоты и гидролизуют при температуре 90–95°С на протяжении 20 мин, а затем устанавливают содержание редуцирующих сахаров эбулиостатическим методом.

Для определения содержания углеводов эбулиостатическим методом готовят следующие растворы:

раствор I*:* 10 г $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ и 0,04 г метиленовый синий отвешивают на аналитических весах, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 1 $дм^3$, объем раствора доводят до метки с помощью дистиллированной воды и перемешивают;

раствор II*:* 50 г сегнетовой соли (K-Na виннокислый) помещают в стакан и растворяют в 200−300 $см^3$ дистиллированной воды. В другом стакане в 100 $см^3$ дистиллированной воды растворяют 4 г желтой кровяной соли. В мерную колбу вместимостью 1 $дм^3$ вливают 150 $см^3$ 50%-ного раствора гидроокиси натрия и раствор сегнетовой соли, перемешивают, добавляют раствор желтой кровяной соли и воду до метки, снова перемешивают.

Эбулиостатический метод основан на восстановлении меди редуцирующим сахаром в щелочной среде при кипячении в присутствии желтой кровяной соли. Образующаяся закись меди не выпадает в осадок, а остается в растворе, давая хорошо растворимое комплексное

соединение с желтой кровяной солью. Реакцию проводят в условиях прямого или обратного (в случае очень разбавленных или темных растворов) титрования горячего медно-щелочного раствора раствором редуцирующих веществ в токе водяного пара. Индикатором конца реакции служит метиленовый синий, который в окислительной среде имеет синюю окраску, а в восстановительной − бесцветный.

Эбулиостат (рис. 1.2) состоит из сосуда *1* (плоскодонная колба), в который через пробку вставлен внутренний сосуд *2*, представляющий собой пробирку. Внутри сосуда *2* имеется стеклянная трубочка, доходящая почти до дна и соединенная с внутренней полостью сосуда *1* отверстием. Над эбулиостатом на штативе крепят бюретку, в пробке эбулиостата находится трубочка с резиновым наконечником и зажимом на конце для регулирования давления пара во внешнем сосуде *1*. Эбулиостат устанавливают таким образом, чтобы кончик бюретки входил в суженное отверстие сосуда *2*.

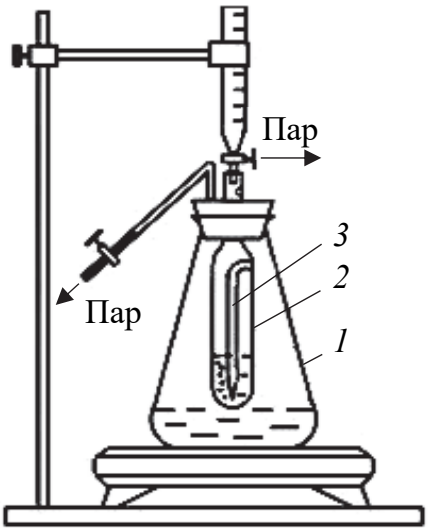


Рис. 1.2. Схема установки эбулиостата:
1 – внешний сосуд;
2 – внутренний сосуд;
3 – стеклянная трубочка

В сосуд *2* заливают пипетками 5 см^3 раствора I и 5 см^3 раствора II. Растворы перемешивают и помещают сосуд в колбу. В сосуд *1* заливают воду, при ее закипании пар поступает через боковое отверстие в сосуд *2*, который должен слегка касаться воды. В верхнюю часть эбулиостата вставляют бюретку. Как только жидкость в сосуде *2* закипит, из бюретки начинают приливать по каплям анализируемый гидролизат, предварительно разбавленный в 5–20 раз. Интенсивность кипения жидкости в эбулиостате регулируют при помощи отводной трубки с зажимом. Окраска раствора изменяется от темно-синей через красно-фиолетовую до желтой или желто-зеленой (конец титрования). Титрование считается оконченным, если окраска раствора не изменится в течение 1−2 мин. Анализ повторяют не менее 2 раз. Для этого прибор разбирают, эбулиостат промывают водой. Количество раствора, пошедшего на титрование в разных определениях, не должно отличаться более чем на 0,1−0,2 см^3.

Из полученных значений находят среднее и рассчитывают содержание редуцирующих веществ в 100 см^3 подготовленной сыворотки (*PB*, мг) по формуле

$$PB = \frac{n \cdot T \cdot 100}{V}, \quad (1.4)$$

где n – разбавление гидролизата; T – титр медно-щелочного раствора по глюкозе (количество глюкозы, которое пошло на восстановление 10 см^3 медно-щелочного раствора при данных условиях), мг; V – объем гидролизата, израсходованного на титрование, см^3.

Титр медно-щелочного раствора по глюкозе устанавливают отдельным титрованием раствора глюкозы с концентрацией 1 мг/см^3. Титр (*T*, мг) рассчитывают по формуле:

$$T = c \cdot V_г, \quad (1.5)$$

где c – концентрация раствора глюкозы, мг/см^3; $V_г$ – объем раствора глюкозы, пошедшего на титрование, см^3.

3. Подготовка посевного материала

Для сбраживания лактозы молочной сыворотки используют дрожжи *Kluyveromyces marxianus* или *Kluyveromyces lactis*.

Сначала проводят выращивание дрожжей в пробирках со скошенной поверхностью агаризованной среды (сусло-агара) на протяжении 48 ч при температуре 30°С.

После берут вторую колбу с подготовленной молочной сывороткой и обогащают минеральными солями в виде 20%-ных растворов в количестве (процент от объема среды): сернокислый аммоний – 0,5; двухзамещенный фосфорнокислый аммоний – 0,2; двухзамещенный фосфорнокислый калий – 0,2; мочевина – 0,25; – хлористый магний – 0,05. Затем данную колбу вместе с остальными двумя (с подготовленной молочной сывороткой) стерилизуют в автоклаве при давлении 0,05 МПа на протяжении 30 мин или на кипящей водяной бане в течение 1 ч.

Колбу, обогащенную солями, засевают культурой из пробирок со скошенным агаром и инкубируют при 30°С в течение 48 ч.

4. Сбраживание углеводов сыворотки в этанол

В оставшиеся две колбы с 50 см^3 подготовленной стерильной молочной сыворотки вносят посевной материал (см. п. 3) в количестве

10%, после чего все переливают в биореакторы с гидрозатвором для сбраживания углеводов молочной сыворотки в спирт при температуре 30°С в течение 24 ч.

5. Анализ бражки

По окончанию сбраживания замеряют объем полученной бражки и центрифугируют ее в течение 15 мин при 5000 мин$^{-1}$. В фугате устанавливают содержание остаточных углеводов (эбулиостатическим методом, см. п. 2) и этанола.

После определения содержания в бражке остаточных углеводов рассчитывают теоретический выход этанола ($V_э$, см^3) по формуле

$$V_э = \frac{(PB_0 - PB) \cdot 0,682}{1000}, \qquad (1.6)$$

где PB_0 – содержание редуцирующих веществ в молочной сыворотке до сбраживания, мг/100 см^3; PB – содержание редуцирующих веществ в молочной сыворотке после сбраживания, мг/100 см^3; 0,682 – теоретическое количество этилового спирта, образующегося при сбраживании 1 г лактозы, см^3; 1000 – перевод миллиграммов сахаров в граммы.

Далее определяют крепость полученной бражки по формуле

$$c = \frac{V_э}{V_б} \cdot 100\%, \qquad (1.7)$$

где $V_э$ – объем спирта после упаривания бражки, см^3; $V_б$ – объем бражки, см^3.

Более точно выход этилового спирта можно определить методом газожидкостной хроматографии. Для подготовки пробы к анализу ее центрифугируют при 15000 мин$^{-1}$ в течение 15 мин, затем фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Содержание этанола в бражке устанавливают на газожидкостном хроматографе с использованием кварцевой капиллярной сильнополярной колонки длиной 60 м, диаметром 535 мм и толщиной слоя сорбента 1 мкм (сорбент – слой поперечно-связанного молекулярно-сшитого полимера полиэтиленгликоля, модифицированного нитротерефталевой кислотой). Газ-носитель – азот с расходом 145 см^3/мин. Программа работы термостата: 60°С (выдержка 4 мин) → 220°С (со скоростью 10°С/мин) → продувка при 220°С (10 мин). Температура пламенно-ионизационного детектора – 280°С, температура испарителя – 220°С. Объем вводимой пробы – 0,1 мкл, деление потока – 15 : 1.

Вопросы для самоконтроля

1. Охарактеризуйте состав молочной сыворотки и биологическую ценность ее основных компонентов.

2. Назовите главные направления переработки молочной сыворотки. Какие из них распространены в Республике Беларусь?

3. Перечислите ведущие направления биотехнологической переработки молочной сыворотки.

4. Какие микроорганизмы используют при биотехнологической переработке молочной сыворотки и какие получают при этом продукты?

5. Назовите основные стадии получения этилового спирта из молочной сыворотки и опишите влияние различных параметров на эффективность данного процесса.

6. Расскажите о подготовке посевного материала и питательной среды при получении этилового спирта из молочной сыворотки.

7. Какие образуются побочные продукты при сбраживании лактозы молочной сыворотки в этиловый спирт?

8. Сформулируйте цель данной лабораторной работы.

9. Как осуществлялась подготовка молочной сыворотки к биотехнологической переработке?

10. Каким образом готовили посевной материал для сбраживания молочной сыворотки?

11. Как проводили сбраживание углеводов сыворотки в этиловый спирт?

12. Каким образом проводили анализ бражки из молочной сыворотки на содержание этилового спирта?

1.3. Практическое значение спиртового брожения. Приготовление пивного сусла

Пиво, согласно СТБ 395-2017 «Пиво», – это пенистый напиток, полученный из пивоваренного солода, хмеля и/или хмелепродуктов и воды с использованием пивных дрожжей, с применением или без применения зерна, зернопродуктов, сахаросодержащих продуктов и другого пивоваренного сырья, содержащий спирт, образовавшийся исключительно в процессе брожения сусла.

Содержание этилового спирта (крепость) в большинстве сортов пива составляет около 3,0–6,0% об., отдельно выделяют безалкогольное пиво – не более 0,5% об.

В Республике Беларусь около 90% общего выпуска пива принадлежит четырем основным производителям: ОАО «Криница» (Минск), ИЗАО «Пивоварни Хайнекен» (Бобруйск, Речица), ОАО «Пивоваренная компания Аливария» (Минск), ОАО «Лидское пиво» (Лида). Также важным игроком на рынке пива является ОАО «Белсолод» – белорусский производитель светлого ячменного пивоваренного солода.

Технология пива включает следующие основные этапы:

– прием, очистка и дробление солода;

– приготовление пивного сусла;

– приготовление чистой культуры дрожжей;

– сбраживание пивного сусла;

– осветление;

– розлив пива в бутылки, бочки, автотермоцистерны.

Основным компонентом пива выступает вода. Ее качество оказывает большое влияние на показатели готовой продукции. Потребление воды для производства пива составляет в среднем 5–6 $дм^3$ на 1 $дм^3$ пива. Вода должна удовлетворять строгим требованиям, предъявляемым к питьевой воде, иметь благоприятные органолептические показатели, быть безвредной по химическому составу и микробиологическим показателям. Общая жесткость воды не должна превышать 5 $моль/дм^3$, а для светлых сортов пива требуется еще более мягкая вода общей жесткостью до 3 $моль/дм^3$. Значение pH воды должно находиться в пределах 6,8–7,3, окисляемость – не выше 332 $мг/дм^3$, содержание сухого остатка – не более 600 $мг/дм^3$.

Препараты хмеля для пивоварения придают пиву специфический горький вкус и аромат. В пивоварении традиционно применяют соцветия женских растений: они содержат горькие смолы (α-горькие кислоты – гумулоны и β-горькие кислоты – лупулоны), полифенольные и ароматобразующие вещества хмеля, придающие пиву горечь и ароматические свойства. Эти вещества нерастворимы в сусле и переходят в него только после изомеризации во время кипячения сусла с хмелем. Хмель служит натуральным консервантом пива, повышает его пенообразующую способность, содействует осветлению сусла и пива за счет осаждения белков.

В мировой практике пивоварения только около 40% хмеля используют в шишках, остальной хмель применяется в гранулированном виде или в виде экстрактов хмеля. По сравнению с шишками эти продукты легче транспортируются и хранятся, при их использовании полнее экстрагируются горькие вещества хмеля.

Не менее важным компонентом пива является солод. От его качества зависит цвет, аромат и полнота вкуса пива.

В процессе солодоращения в зерне высвобождаются ферменты, способные при определенных условиях превращать крахмал, который дрожжи не способны ассимилировать, в сбраживаемые сахара (преимущественно мальтозу).

Производство пива начинается с отбора необходимых количеств солода ячменя, пшеницы, овса или ржи, пророщенных в солодовом цеху.

В зависимости от используемого сырья и способа обработки солод бывает:

- ячменный, ржаной, пшеничный и т. д.;
- светлый, карамельный, жженый, темный и т. д.

В качестве базового в пивоварении применяют светлый ячменный солод, дополняя его другими видами солода в зависимости от характеристик пива, которое необходимо приготовить. Кроме этого, в производстве используют колер, солодовые экстракты, солодовую муку (порошок) и некоторые другие компоненты.

Сочетание различных видов зерна в процессе пивоварения часто называют балансом зерна.

Приготовление пивного сусла – это этап производства пива, целью которого является извлечение экстрактивных веществ сырья (солод, несоложеные зернопродукты) в раствор, отделение полученного раствора (сусла) от нерастворенных веществ (дробины) с последующей варкой его с хмелем для придания суслу специфических аромата и горечи, а также для стабилизации его хмелевого состава.

Приготовление пивного сусла включает в себя следующие технологические стадии:

– затирание зернопродуктов;

– фильтрование затора;

– кипячение сусла с хмелем (варка).

Целью затирания является перевод в водный раствор нерастворимых компонентов сырья, главным образом крахмала, части белков солода и других в растворимый экстракт в результате ферментативных реакций. Полученный раствор называют суслом, а сумму растворенных в нем веществ – экстрактом. Основными продуктами гидролиза крахмала в сусле выступают глюкоза, мальтоза, декстрины. Продукты гидролиза белков участвуют в формировании вкуса и аромата пива, определяют его пенообразование и пеностойкость.

При затирании протекают следующие процессы:

• переход образовавшихся растворимых веществ в раствор;

• ферментативный гидролиз некоторых растворимых веществ солода;

• химическое взаимодействие между некоторыми веществами;

• действие и последующая инактивация ферментов (в конце затирания);

• снижение уровня pH затора.

Для различных групп ферментов существуют свои температурные оптимумы:

– 36–40°C – цитолитическая пауза;

– 45–50°C – белковая (протеолитическая) пауза;

– 62–65°C – мальтозная (амилолитическая) пауза;

– 70–75°C – пауза для осахаривания;

– 77–78°C – температура окончания затирания.

Успешное проведение затирания предопределяется в основном созданием оптимальных условий (температура, концентрация экстрактивных веществ, pH) для ферментативных реакций и в первую очередь для ферментативного гидролиза крахмала и белков.

В практике различают два главных типа затирания: инфузионное (настойный способ) и отварочное (затирание с отварками).

При инфузионном способе дробленый солод смешивают с водой и медленно нагревают затор с выдержкой соответствующих пауз длительностью 20–30 мин для оптимального действия ферментов.

При отварочном способе часть затора (отварка) подвергается кипячению с целью клейстеризации крахмала, что повышает атакуемость крахмала ферментами и увеличивает выход экстракта.

По окончании затирания сусло фильтруют, а затем кипятят с хмелем. Фильтрование затора предусматривает отделение полученного раствора (сусла) от нерастворимых веществ (дробины). Этот процесс включает два этапа:

– отделение полученного сусла с помощью фильтрования – получение первого сусла;

– вымывание оставшегося после фильтрования в дробине сусла с помощью горячей воды (выщелачивание или промывание дробины).

При варке сусла с хмелем наибольшее значение имеют экстракция ароматических и горьких веществ хмеля. Норма закладки хмеля составляет 10–15 г на 1 дал готового сусла.

В результате кипячения сусла с хмелем происходят следующие процессы:

• испарение избытка воды с целью получения сусла с заданной массой сухих веществ;

• инактивация ферментов солода, коагуляция белков и образование «бруха»;

• растворение ценных компонентов хмеля;

• испарение летучих компонентов, в частности диметилсульфида, отрицательно сказывающихся на вкусе и аромате пива.

Кроме того, в ходе кипячения происходит стерилизация сусла, необходимая для обеспечения чистоты брожения и получения стойкого продукта. Стерилизация достигается после 15 мин кипячения.

Затем осветленное горячее сусло поступает на охлаждение. Холодное сусло, готовое для внесения дрожжей, должно быть насыщено растворенным кислородом. С этой целью используют впрыск стерильного отфильтрованного воздуха.

Лабораторная работа № 3
ПОЛУЧЕНИЕ ПИВНОГО СУСЛА И ОЦЕНКА ЕГО КАЧЕСТВЕННЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ

Цель работы: приобрести навыки получения пивного сусла и освоить методику оценки его основных показателей.

Реактивы, материалы и оборудование: солод (ячмень), гранулированный хмель, сухие дрожжи, 0,1 н. раствор йода, 0,1 н. раствор гидроксида натрия, фенолфталеин, дезинтегратор, электроплитки, заторные стаканы вместимостью 1000 $см^3$, колбы конические вместимостью 500 $см^3$, термометры, цилиндры, ареометр Баллинга, бюретка, pH-метр.

Порядок выполнения работы. 1. Затирание. 2. Фильтрация. 3. Охмеление сусла. 4. Анализ готового пивного сусла.

1. Затирание

Затирание начинают в заторных стаканах, в которые отвешивают по 120 г измельченного солода, заливают 600 $см^3$ воды с температурой 52°С и выдерживают в течение 25 мин в водяном термостате (водяной бане), далее температуру затора медленно поднимают до 63°С и выдерживают еще в течение 50 мин. Затем затор нагревают до 70°С

и выдерживают до полного осахаривания. Контроль процесса осахаривания проводят с помощью йодной пробы.

Определение степени осахаривания затора. Продолжительность превращения крахмала в редуцирующие сахара под действием ферментов солода характеризуется временем (минуты), необходимым для полного осахаривания затора при 70°С. Когда температура затора достигнет 70°С, через каждые 5 мин начинают отбирать стеклянной палочкой каплю затора и на предметном стекле смешивать ее с каплей раствора йода (смесь 2 $см^3$ 0,1 н. раствора йода с 8 $см^3$ воды), слегка наклоняя пластинку. Для сравнения на ту же пластинку помещают каплю дистиллированной воды, смешанной с каплей раствора йода. Оценку окраски проводят на белом фоне. Осахаривание завершено, если окраска капли затора при добавлении йода не изменяется.

Далее затор подогревают до 75°С, выдерживают в течение 10 мин и фильтруют.

2. Фильтрация

Фильтрацию осуществляют на воронках через тройной слой марли, перенося в нее весь затор. Сначала отфильтровывают первое сусло до осушения дробины, далее промывают дробину горячей водой (температура 75–80°С) до тех пор, пока количество отфильтрованного сусла не достигнет 600 $см^3$ (не более). Затем полученное сусло охлаждают до 20°С и определяют ареометром Баллинга содержание в нем сахаров (должно быть не менее 11%), замеряют объем, записывают результаты измерения.

3. Охмеление сусла

Для коагуляции белков суслу дают прокипеть 10 мин, вносят первую порцию хмеля (1,0 г хмеля / 1,0 л сусла) в количестве 75% от необходимого. **Вносить нужно осторожно, так как возможно резкое вспенивание кипящего сусла и выброс его из колбы!**

Сусло с хмелем кипятят 30 мин, стараясь сохранить постоянный объем сусла, доливая кипящей воды, если наблюдается сильное испарение. Далее добавляют последнюю порцию – 0,3 г хмеля на 1 л сусла и кипятят еще 10 мин. После кипячения с хмелем сусло охлаждают до 20°С, фильтруют через двойной слой марли, отливают 400 $см^3$ сусла в бутылку, доводят молочной кислотой pH сусла до 5,3. Далее вносят сухие дрожжи в количестве 0,3 г на 1 л сусла, закрывают

бутылку, предварительно выпустив излишек воздуха, и оставляют при комнатной температуре на 7 сут для получения молодого пива. Оставшиеся 200 см^3 охмеленного сусла оставляют для определения основных качественных показателей готового сусла.

4. Анализ готового пивного сусла

Активную кислотность определяют pH-метром в сусле, получаемом после фильтрования затора через бумажный фильтр. Величина pH влияет на осаждение белков при кипячении, растворимость горьких веществ, содержащихся в хмеле, ферментативное расщепление при брожении, а также на цвет сусла и пива.

Охмеленное готовое сусло имеет pH 5,2–5,5. Отклонение от этой величины в щелочную сторону, наблюдаемое обычно при работе на карбонатной воде, свидетельствует о необходимости подготовки воды для затирания.

При определении *титруемой кислотности* темное сусло цветом выше 3 цветовых единиц предварительно разбавляют водой в соотношении 1 : 4. В коническую колбу вместимостью 100 см^3 помещают 10 см^3 лабораторного сусла, добавляют 40 см^3 воды, 3–4 капли раствора фенолфталеина и титруют 0,1 н. раствором гидроксида натрия до появления слабо-розовой окраски, которая сохраняется в течение 30 с. Если окраска исчезает раньше, то проводят дополнительное титрование.

Кислотность сусла (X, см^3) рассчитывают по количеству израсходованного 0,1 н. раствора гидроксида натрия на 100 см^3 сусла по формуле

$$X = \frac{V \cdot K_1 \cdot K_2 \cdot 100}{10}, \qquad (1.8)$$

где V – объем 0,1 н. раствора гидроксида натрия, израсходованный на титрование, см^3; K_1 – коэффициент поправки рабочего раствора гидроксида натрия; K_2 – коэффициент разбавления темного сусла (K_2 = 4–5), для светлого (K_2 = 1); 100 – пересчет на 100 см^3 сусла; 10 – объем пробы сусла, взятой для анализа, см^3.

Для обеспечения стандартной кислотности пива кислотность сусла (1 см^3 1 н. раствора гидроксида натрия на 100 см^3 сусла) не должна превышать (ориентировочно) следующие величины: для 11%-ного – 2,3; для 12%-ного – 2,4; для 13%-ного – 2,7; для 14%-ного – 3,0; для 18%-ного – 4,6.

Для *определения концентрации экстрактивных веществ* применяют ареометры-сахаромеры с интервалом делений 0–15, 5–15, 10–20%. В чистых растворах сахарозы сахаромеры показывают процент растворенного сахара по массе (1 г в 100 г). В нечистых растворах (например, в пивном сусле) они показывают видимое содержание сухих веществ в массовых процентах.

При анализе пробу сусла охлаждают до 20°С и наливают в стеклянный цилиндр, диаметр которого в 2–3 раза больше диаметра сахаромера. Цилиндр ставят на горизонтальный поддон и плавно погружают чистый и сухой сахаромер в сусло на 2–4 деления глубже по сравнению с глубиной, на которой он сам устанавливается в жидкости. При погружении сахаромера избыток сусла вытекает в поддон. Отсчет концентрации экстрактивных веществ по шкале сахаромера производят через 2–3 мин (необходимые для выравнивания температуры сусла и сахаромера) по верхнему мениску при положении глаза на уровне сусла в цилиндре. Для достижения большей точности измерения ареометром придерживаются следующих правил:

– погруженный в жидкость ареометр не должен касаться стенок цилиндра;

– поверхность ареометра должна быть обезжиренной, сухой и чистой;

– исследуемая жидкость не должна содержать пузырьков воздуха и пены.

Вопросы для самоконтроля

1. Что такое пивное сусло и какая цель его приготовления?
2. Назовите основные технологические операции приготовления пивного сусла.
3. Каким образом определяют степень осахаривания сусла?
4. Назовите цель и режимы затирания.
5. Для чего осуществляют кипячение сусла с хмелем?
6. При какой температуре сусла и с какой целью вносят пивные дрожжи?
7. Назовите цель данной лабораторной работы.
8. Как осуществляли затирание?
9. Каким образом выполняли охмеление сусла?
10. Как определяли активную кислотность сусла и что показывает данный параметр?
11. Каким образом определяли титруемую кислотность сусла?
12. Как определяли концентрацию сухих веществ?

1.4. Оценка качественных показателей пива

Пиво, производимое в Республике Беларусь, должно соответствовать требованиям СТБ 395-2017 «Пиво» и изготавливаться по инструкции на конкретное наименование, согласованной и утвержденной в установленном порядке, с соблюдением санитарных норм и правил, гигиенических нормативов для производства пищевой продукции.

По органолептическим показателям пиво должно соответствовать требованиям, приведенным в табл. 1.4.

Таблица 1.4

Органолептические показатели пива

<table>
<tr><td rowspan="3">Наименование показателя</td><td colspan="4">Тип пива</td></tr>
<tr><td colspan="2">Фильтрованное пиво</td><td colspan="2">Нефильтрованное пиво</td></tr>
<tr><td>светлое</td><td>темное</td><td>светлое</td><td>темное</td></tr>
<tr><td>Прозрачность</td><td colspan="2">Прозрачная пенящаяся жидкость без осадка и посторонних включений, не свойственных пиву. В процессе хранения допускается появление частиц белково-дубильных соединений. Для пшеничного пива допускается опалесценция</td><td colspan="2">Непрозрачная или прозрачная с опалесценцией пенящаяся жидкость без посторонних включений, не свойственных пиву. В процессе хранения допускается появление частиц белково-дубильных соединений. Допускается дрожжевой осадок</td></tr>
<tr><td>Аромат</td><td colspan="2">Чистый, сброженный, с хмелевым ароматом, без посторонних запахов</td><td colspan="2">Сброженный солодовый, с хмелевым ароматом, допускается дрожжевой оттенок, без посторонних запахов</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Вкус</td><td>Чистый, сброженный, солодовый, с хмелевой горечью, без посторонних привкусов. В пшеничном пиве присутствуют пряно-ароматичные тона во вкусе и аромате</td><td>Полный солодовый с выраженным привкусом карамельного или жженого солода, без посторонних привкусов</td><td>Сброженный солодовый, с хмелевой горечью, допускается дрожжевой привкус. В пшеничном пиве присутствуют пряно-ароматические тона во вкусе и аромате</td><td>Солодовый с выраженным привкусом карамельного или жженого солода, без посторонних привкусов</td></tr>
<tr><td colspan="4">В пиве с экстрактивностью начального сусла 15% и выше присутствует винный привкус</td></tr>
</table>

На вкус пива влияют многие факторы: состав воды и солода, качество хмеля, штамм дрожжей, режимы приготовления сусла, брожения и дображивания молодого пива.

Важным свойством пива является полнота вкуса, обусловливаемая наличием сложного вкусового комплекса (декстрины, меланоидины, азотистые вещества, экстрагируемые вещества хмеля, этанол, высшие спирты и эфиры). Большое значение для вкуса пива имеет хорошее насыщение диоксидом углерода, что придает ему освежающий вкус. Диоксид углерода в пиве должен быть связан химически и тонко диспергирован, т. е. находиться в виде мельчайших пузырьков, что обеспечивает его медленное выделение.

Характерная горечь пива зависит от качества и свежести хмеля. Хмель, соответствующий нормам качества, придает пиву приятную мягкую горечь. Если же в пиве ощущается грубая горечь, то, как правило, использованный хмель не соответствовал всем нормам качества. Хмелевая горечь в пиве хорошего качества должна ярко ощущаться только в момент его употребления, затем ощущение горечи быстро проходит. По физико-химическим показателям пшеничное светлое и темное пиво должно соответствовать требованиям, указанным в табл. П2.

Признаком высокого качества пива является густая тонкодисперсная и стойкая пена. Пиво с плотной пеной обладает полнотой вкуса и долго сохраняет свежесть. По внешнему виду пена бывает компактная, мелкая, плотная, пузырчатая, рыхлая, неустойчивая. Пена состоит из пузырьков диоксида углерода, покрытых пленкой поверхностно-активных веществ. К таким веществам относятся пептоны, полипептиды, горькие вещества хмеля, некоторые красящие вещества и др.

Важной характеристикой является продолжительность существования пены, т. е. ее стойкость. Под пеностойкостью понимают время (в секундах или минутах), прошедшее с момента возникновения пены до ее разрушения. При наливании пива в бокал должно происходить медленное выделение пузырьков CO_2 с образованием устойчивой компактной пены.

В первый момент скорость образования пены значительно превышает скорость ее исчезновения, поэтому образуется шапка пены. Затем выделение CO_2 замедляется, распад пены начинает преобладать над ее образованием, и объем пены уменьшается. Скорость исчезновения пены зависит от ее стойкости. Пенообразование характеризуется высотой слоя пены (в миллиметрах), появившегося при выливании пива с определенной высоты в специальный бокал, и стойкостью пены в минутах.

Лабораторная работа № 4
ОЦЕНКА КАЧЕСТВЕННЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГОТОВОГО ПИВА

Цель работы: приобрести навыки определения органолептических и физико-химических показателей молодого и готового пива.

Реактивы, материалы и оборудование: молодое пиво из ЛР № 3, готовое пиво, набор пипеток стеклянных 1–10 см^3, колбы конические вместимостью 250 см^3, воронки, фильтровальная бумага, термометры, цилиндры, пикнометры, ареометр для спирта, бюретки, рефрактометр, аналитические весы, роторный испаритель, секундомер.

Порядок выполнения работы. 1. Определение содержания сухих веществ. 2. Анализ содержания видимого экстракта. 3. Количественное определение этилового спирта. 4. Определение содержания действительного экстракта. 5. Анализ кислотности. 6. Определение органолептических показателей.

1. Определение содержания сухих веществ

Берут по 10 см^3 молодого пива, полученного в результате сбраживания сусла (ЛР № 3), и готового пива, фильтруют через бумажный фильтр и определяют содержание сухих веществ с использованием рефрактометрического метода с помощью рефрактометра РЛ-2.

Вначале рукояткой рефрактометра откидывают верхнюю призму, наносят на нижнюю призму несколько капель пива, доведенного до 20°С, и опускают верхнюю призму. Источник света направляют в окошко измерительной призмы, расположенное на центральной части корпуса (анализ темных растворов). При анализе светлых растворов используют зеркало на боковой части корпуса.

Затем, наблюдая в окуляр, передвигают его из нижнего положения вверх, пока в поле зрения не появится граница света и тени. Если эта граница выражена не резко, то передвигают компенсатор дисперсии рычажком. Дальнейшим передвижением окуляра точно освещают линию раздела с указателем, имеющим вид пунктирной линии или круга с точкой в центре. Далее отсчитывают через окуляр показания рефрактометра. В окуляре видны две шкалы: с левой стороны – коэффициент преломления, с правой – проценты сухих веществ. Отмечают то деление шкалы, через которое проходит граница света и тени.

Призмы рефрактометра должны всегда быть чистыми! После каждого измерения их промывают дистиллированной водой с помощью ваты или марли и вытирают насухо.

2. Анализ содержания видимого экстракта

Видимый экстракт пива (кажущийся экстракт) – массовая доля экстракта, определяемая в пиве после удаления двуокиси углерода при наличии спирта.

Для определения данного показателя берут пробы анализируемых образцов пива по 250 $см^3$, освобождают от излишнего диоксида углерода и нерастворимых веществ встряхиванием в колбе при комнатной температуре, многократно (не менее 10 раз) переливая его из колбы в колбу и фильтруя через бумажный фильтр.

Тщательно промытый и высушенный пикнометр взвешивают на лабораторных весах до четвертого знака. Для установления истинной массы пикнометра вводят поправку. Для этого от результата взвешивания вычитают массу находящегося в пикнометре воздуха, принимая, что масса 1 $см^3$ воздуха равна 0,0013 г. Затем пикнометр заполняют дистиллированной водой до метки и погружают в водяную баню таким образом, чтобы уровень воды был выше уровня воды в пикнометре и выдерживают в течение (20 ± 5) мин при температуре (20,0 ± 1,0)°С. По истечении указанного времени пикнометр вынимают из водяной бани, тщательно вытирают и проверяют уровень воды по метке, устанавливая его по верхнему мениску. Избыток воды удаляют полоской фильтровальной бумаги. При недостатке ее доливают до метки пипеткой.

Пикнометр с водой взвешивают на весах до четвертого знака после запятой. Процедуры наполнения пикнометра водой, термостатирования, установки мениска и взвешивания повторяют не менее трех раз. За конечный результат определения массы пикнометра с водой берут среднее арифметическое значение. После этого воду из пикнометра выливают, промывают его смесью этанола с диэтиловым эфиром и высушивают в сушильном шкафу 25–30 мин, а затем охлаждают в эксикаторе.

Качество подготовки пикнометра к дальнейшей работе оценивают по отсутствию влаги на его внутренней поверхности. Затем медленно наполняют пикнометр подготовленным образцом пива, погружают его на (20 ± 5) мин при температуре (20,0 ± 1,0)°С в водяную баню. Проверяют уровень пива в пикнометре по верхнему мениску. Избыток отбирают пипеткой или фильтровальной бумагой, свернутой тонкой трубочкой, после этого горлышко внутри вытирают таким же образом, а пикнометр тщательно обтирают снаружи мягкой тканью и взвешивают. Процедуры наполнения пикнометра исследуемым

образцом, термостатирования, установки мениска и взвешивания повторяют не менее трех раз. За конечный результат определения массы пикнометра с анализируемой пробой берут среднее арифметическое значение.

Плотность образцов пива рассчитывают по формуле

$$\rho_{20}^{20} = \frac{m_1 - m}{m_2 - m}, \qquad (1.9)$$

где m_1 – масса пикнометра с анализируемым образцом пива, г; m_2 – масса пикнометра с водой, г; m – масса пикнометра без воздуха, г.

По табл. П3 находят соответствующее содержание экстрактивных веществ.

3. Количественное определение этилового спирта

Количество этилового спирта в пиве находят дистилляционным методом, который основан на отгонке спирта из пива с использованием перегонной установки (рис. 1.3) и определении относительной плотности дистиллята.

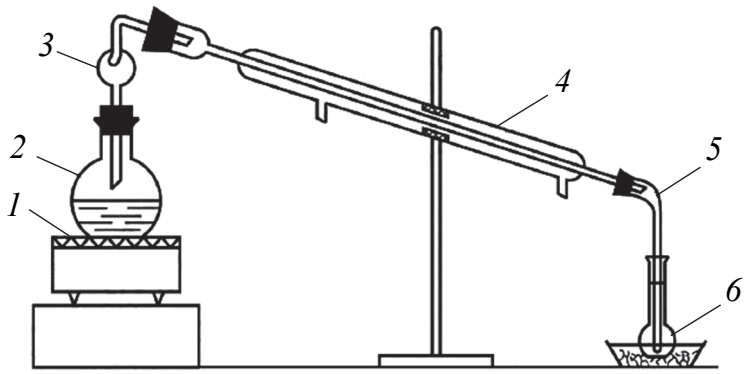


Рис. 1.3. Схема лабораторной установки для перегонки спирта:
1 – колбонагреватель; *2* – перегонная колба объемом от 300 до 500 см^3;
3 – каплеуловитель; *4* – обратный холодильник; *5* – алонж; *6* – приемник для дистиллята (колба объемом 250 см^3)

Пиво медленно нагревают до кипения, и спирт, испаряясь, проходит через холодильник, охлаждается, конденсируется и стекает в охлаждаемый приемник. Как только в приемнике накопится 2/3 от объема перегоняемой жидкости, процесс прекращают, приемную колбу с содержимым охлаждают и отделяют от холодильника. Затем содержимое колбы перемешивают, определяют в нем плотность с помощью ареометров для спирта или пикнометра (см. п. 2) при температуре

(20,0 ± 0,2)°С, после чего по табличным данным находят предполагаемую концентрацию этилового спирта в процентах (табл. П1).

Отгонку спирта можно осуществить и с использованием вакуумроторного испарителя.

4. Определение содержания действительного экстракта

Для оценки содержания действующего экстракта перегонную колбу с остатком после отгонки спирта (см. п. 3) охлаждают, вносят дистиллированную воду до массы содержимого (100 ± 1) г, перемешивают и определяют относительную плотность с помощью пикнометра при температуре (20,0 ± 0,2)°С (см. п. 2).

Массовую долю действительного экстракта, в процентах, определяют в зависимости от относительной плотности раствора согласно табл. П3.

5. Анализ кислотности

В колбу вместимостью 100 см^3 вливают 10,0 см^3 освобожденного от CO_2 пива (см. п. 1), добавляют дистиллированную воду объемом 40 см^3 и 3–4 капли фенолфталеина.

Содержимое колбы титруют из бюретки 0,1 н. раствором гидроксида натрия до появления слабой розовой окраски, которая должна сохраняться не менее 30 с. Если окраска исчезает раньше, процесс титрования продолжают.

Кислотность пива (X, см^3) определят количеством раствора 0,1 н. гидроксида натрия, пошедшего на титрование 100 см^3 пробы, и вычисляют по формуле

$$X = \frac{V \cdot K_1 \cdot K_2 \cdot 100}{10}, \qquad (1.10)$$

где V – объем 0,1 н. раствора гидроксида натрия, израсходованный на титрование, см^3; K_1 – коэффициент поправки рабочего раствора гидроксида натрия; K_2 – коэффициент разбавления темного пива (K_2 = 4–5), для светлого (K_2 = 1); 100 – пересчет на 100 см^3 пива; 10 – объем пробы пива, взятой для анализа, см^3.

6. Определение органолептических показателей

Методы определения органолептических показателей продукции включают в себя определение прозрачности (для фильтрованной продукции), наличия осадка, цвета, аромата, вкуса, наличия и качества

пены (для продукции, насыщенной двуокисью углерода) посредством органов чувств человека.

Прозрачность – отсутствие опалесценции или помутнения, а также наличие осадка, технологических и посторонних включений. Определяют визуально. Для этого наливают 50–120 $см^3$ анализируемой продукции в дегустационный бокал – бокал из бесцветного прозрачного стекла вместимостью 150–400 $см^3$ и диаметром не менее 40 мм и не более 65 мм, просматривают в проходящем свете.

Цвет анализируемой продукции определяют на белом фоне в проходящем свете.

Аромат и *вкус* определяют органолептически немедленно после налива пробы в дегустационный бокал при температуре (12 ± 2)°С. Оценивают соответствие аромата и вкуса требованиям документа, по которому изготовлена продукция.

Для определения *высоты пены* и *пеностойкости* стакан устанавливают на площадку штатива с кольцом, укрепленным на стойке штатива горизонтально на такой высоте, чтобы расстояние от верхней плоскости кольца до края стакана равнялось (25 ± 3) мм.

При наливе анализируемого образца пива в стакан горлышко бутылки или стенка банки должны лежать на кольце штатива таким образом, чтобы наливаемая продукция падала в центр стакана. Продукцию наливают в стакан спокойно, не наклоняя бутылку или банку, до достижения пеной края стакана (полное совпадение плоскости пены с плоскостью края стакана).

В момент образования резкой границы между слоем пены и жидкостью немедленно измеряют линейкой или штангенциркулем высоту пены в миллиметрах, одновременно включают секундомер и следят за оседанием пены. Секундомер останавливают при появлении в слое пены разряжения (просвета) до поверхности жидкости или спадания слоя пены по всей поверхности до образования пленки. Результат измерения высоты пены выражают в миллиметрах, округляя полученное значение до последней цифры 0 или 5. Пеностойкость выражают целым числом в минутах или округляя полученный результат до 30 с.

Вопросы для самоконтроля

1. Перечислите и охарактеризуйте основные органолептические показатели пива.
2. Какие факторы влияют на вкус пива?
3. Что такое пеностойкость и пенообразование пива?

4. Сформулируйте цель данной лабораторной работы.

5. Перечислите и охарактеризуйте основные физико-химические показатели пива, определяемые в лабораторной работе.

6. Опишите последовательность работы с лабораторным рефрактометром при определении показателя содержания сухих веществ.

7. Каким методом определяли содержание видимого и действительного экстракта? В чем заключается отличие данных показателей?

8. Как определяли содержание этилового спирта в пиве?

9. Каким образом определяли кислотность пива?

10. Назовите органолептические показатели пива, которые определяли в данной лабораторной работе.

Раздел 2

МОЛОЧНОКИСЛОЕ БРОЖЕНИЕ

Молочнокислое брожение находит широкое применение в пищевой отрасли промышленности при производстве кисломолочных продуктов (творог, сметана, кефир, сыры и др.), а также при приготовлении хлебных заквасок и квашении овощей (капуста, огурцы). Кроме того, молочнокислое брожение незаменимо при силосовании кормов.

Молочнокислые бактерии – специфическая группа микроорганизмов, осуществляющая сбраживание сахаров (глюкоза, лактоза) до молочной кислоты (гомоферментативное молочнокислое брожение). Однако в процессе молочнокислого брожения наряду с молочной кислотой могут синтезироваться и побочные продукты брожения (гетероферментативное молочнокислое брожение).

Применяемые в производстве высокоактивные молочнокислые бактерии относят к 4 родам: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* и *Pedicoccus*. Одни из них (лактобацилы, стрептобактерии, стрептококки и педикокки) являются гомоферментативными, образующими при сбраживании гексоз преимущественно молочную кислоту (около 90%), другие (бетабактерии и лейконостоки) – гетероферментативными, образующими молочную и уксусную кислоты, диоксид углерода, возможно, этиловый спирт.

В качестве источников энергии и углевода молочнокислые бактерии могут использовать мальтозу, глюкозу, лактозу, осахаренный крахмал и др. Особенностью многих лактобактерий является требовательность к питательным средам: многие из них нуждаются в витаминах из группы В, некоторых аминокислотах, пуринах и пиримидинах, отдельных органических кислотах алифатического ряда (уксусная, лимонная, олеиновая). При целенаправленном получении молочной кислоты в качестве субстратов используют сиропы из лактозы либо лактозу, находящуюся в молочной сыворотке, а также глюкозные сиропы и мелассу.

Для сбраживания глюкозы и гидролизатов крахмала на практике обычно применяют бактерии *Lactobacillus delbrueckii*, *L. bulgaricus*, *L. leichmanii* (одни или в смеси между собой или со *Streptococcus lactis*), для сбраживания мальтозы иногда используют *L. casei*. В промышленном производстве молочной кислоты преимущество отдают

термофильным гомоферментативным видам, активно синтезирующим целевой продукт при температуре, близкой к 50°С.

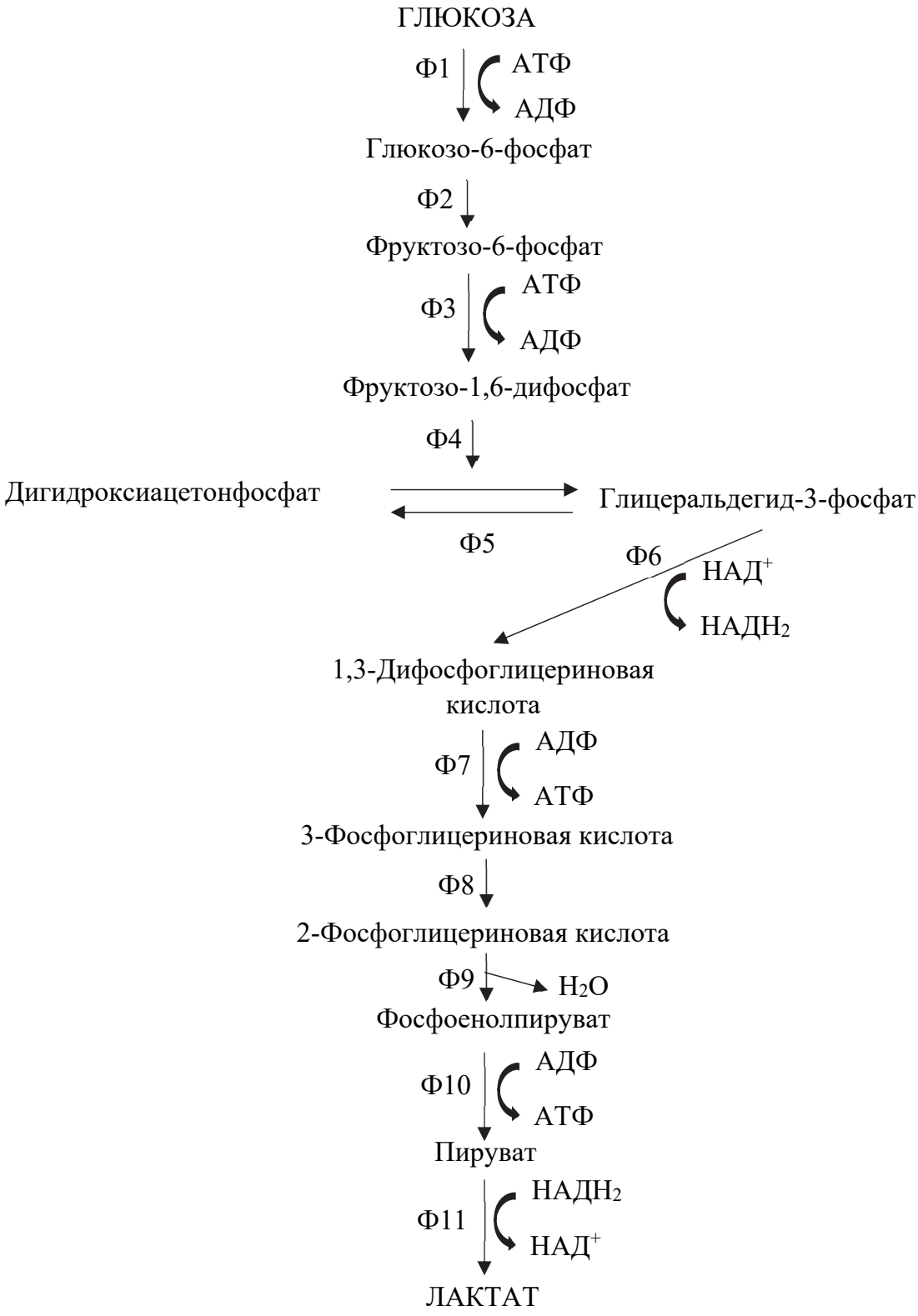
На рисунке (с. 48) представлен химизм процесса гомоферментативного молочнокислого брожения, в котором принимают участие следующие ферменты: Ф1 – гексокиназа; Ф2 – глюкозофосфатизомераза; Ф3 – фосфофруктокиназа; Ф4 – фруктозо-1,6-дифосфатальдолаза; Ф5 – триозофосфатизомераза; Ф6 – 3-фосфоглицеральдегид дегидрогеназа; Ф7 – фосфоглицераткиназа; Ф8 – фосфоглицеромутаза; Ф9 – енолаза; Ф10 – пируваткиназа; Ф11 – лактатдегидрогеназа. Теоретически из 1 моля глюкозы должно образоваться 2 моля лактата. Однако на практике эта величина несколько ниже (1,8 моля), т. е. выход продукта от субстрата достигает 90%.

Принципиальная технологическая схема получения L, D/L-молочной кислоты состоит в следующем: мелассную среду, содержащую 5–20% сахара, вытяжку солодовых ростков, дрожжевой экстракт, витамины, фосфат аммония, засевают суспензией клеток-продуцента *L. delbrueckii*. Брожение протекает при 49–50°С и исходном pH 6,3–6,5. По мере образования молочной кислоты ее периодически нейтрализуют мелом. Весь цикл ферментации завершается за 5–10 дней; при этом в культуральной жидкости содержатся 12–14% лактата кальция и 0,1–0,5% сахарозы. Клетки бактерий и мел отделяют фильтрованием (отход), фильтрат упаривают до концентрации 30%, охлаждают до 25°С и подают на кристаллизацию, которая длится 1,5–2,0 сут.

Кристаллы лактата кальция обрабатывают серной кислотой при 60–70°С, гипс выпадает в осадок, а к надосадочной жидкости добавляют желтую кровяную соль при 65°С для удаления ионов железа, а затем сульфат натрия – для освобождения от тяжелых металлов. Красящие вещества удаляют с помощью активированного угля. После этого раствор молочной кислоты подвергают вакуум-упариванию до содержания 50 или 80%. Оставшийся не до конца очищенный раствор молочной кислоты используют для технических целей.

Более очищенную кислоту можно получать при перегонке ее сложных метиловых эфиров, экстракцией простым изопропиловым эфиром в противоточных насадочных колоннах.

С помощью *L. bulgaricus* получают молочную кислоту из молочной сыворотки. Для сбраживания гидролизатов пентозанов, получаемых из кукурузных кочерыжек, соломы и других видов пентозного сырья, можно использовать клетки *L. brevis*.



Гомоферментативное молочнокислое брожение

В конце 80-х гг. XX в. разработана технология получения молочной кислоты с помощью клеток *Streptococcus thermophilus*, адгезированных на активированном угле и помещенных в биореактор, работающий

по принципу «кипящего» или псевдоожиженного слоя. В нижней части происходит сорбция субстрата, в верхней – молочной кислоты, благодаря чему нет надобности в регуляции pH в процессе ферментации. Продуктивность системы – 12 г/л·ч$^{-1}$ молочной кислоты.

Одним из важных этапов получения молочной кислоты является ее выделение и очистка. Культуральная жидкость содержит ряд примесей, таких как остаточные сахара, питательные вещества, органические кислоты и др. Учеными Республики Беларусь предложен способ выделения молочной кислоты из многокомпонентного водного раствора экстракцией в кислой среде 50%-ным раствором триоктиламина в октане с добавлением 5–10 об. % октанола с последующей реэкстракцией из органической фазы в виде лактата натрия водным раствором гидроксида натрия.

Лабораторная работа № 5
КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ

Цель работы: приобрести практические навыки сбраживания молочной сыворотки для получения молочной кислоты.

Реактивы, материалы и оборудование: молочная сыворотка, дрожжевой экстракт, глюкоза, мел, 2%-ная серная кислота, растворы I и II для определения редуцирующих веществ, молочнокислые бактерии, колбы вместимостью 100 см^3 и 250 см^3, цилиндр, эбулиостат, бюретка, центрифуга, термостат, шейкер-инкубатор.

Порядок выполнения работы. 1. Подготовка молочной сыворотки. 2. Получение посевного материала. 3. Сбраживание углеводов сыворотки с получением молочной кислоты. 4. Выделение молочной кислоты.

1. Подготовка молочной сыворотки

Сырьем для производства молочной кислоты служит молочная сыворотка всех видов.

Для культивирования молочнокислых бактерий берут 300 см^3 молочной сыворотки и центрифугируют при 5000 мин$^{-1}$ в течение 10 мин. После в осветленную молочную сыворотку добавляют дрожжевой экстракт и глюкозу в количестве 3% и 2% соответственно от массы сыворотки, уровень pH доводят до 6,5. Затем подготовленную сыворотку кипятят на водяной бане не менее 1 ч.

2. Получение посевного материала

Посевной материал в виде чистой культуры одного из видов бактерий-продуцентов (*Lactobacillus delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei* или *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*) готовят на молочной сыворотке (см. п. 1) в несколько этапов. Сначала культуру бактерий-продуцентов выращивают на скошенной среде молочный агар в течение 48 ч. На втором этапе получают жидкую бактериальную суспензию, тем самым увеличивая объемы посевного материала. Для этого с соблюдением условий асептики в пробирку с посевным материалом вливают 6–8 $см^3$ подготовленной молочной сыворотки и бактериальной петлей снимают культуру с агаризованной питательной среды в колбу, содержащую подготовленную молочную сыворотку (общий объем молочной сыворотки в колбе должен составлять 50 $см^3$), и инкубируют на шейкере-инкубаторе в течение 3 сут при температуре 30°С.

3. Сбраживание углеводов сыворотки с получением молочной кислоты

В качестве основной среды для ферментации используют свежую осветленную молочную сыворотку (не менее 200 $см^3$), в которой определяют содержание редуцирующих веществ по методике, описанной в п. 2 ЛР № 2.

Далее в сыворотку вносят мел в количестве 3% от содержащихся в сыворотке редуцирующих веществ и пастеризуют кипячением с выдержкой на водяной бане в течение 40–50 мин, после чего охлаждают до 30°С.

В подготовленную охлажденную сыворотку вносят посевной материал из расчета 10–20% от объема среды. Количество посевного материала зависит от активности штаммов и продолжительности брожения. Процесс брожения проводят в колбах в течение 5–7 сут. Температуру поддерживают в пределах 30°С. **Колбы должны быть заполнены средой не менее чем на ½ объема!**

4. Выделение молочной кислоты

После окончания процесса брожения среда, содержащая лактат кальция, нагревается до температуры 90–95°С для денатурации сывороточных белков и микробных клеток. Денатурированные белковые соединения отделяют центрифугированием в течение 15 мин при 5000 $мин^{-1}$.

В осветленной культуральной жидкости определяют остаточное количество редуцирующих веществ (см. п. 2 ЛР № 2), а также общую кислотность (X, см^3) в результате титрования 10 см^3 культуральной жидкости раствором 0,1 н. гидроксида натрия в присутствии фенолфталеина:

$$X = \frac{V \cdot K_1 \cdot K_2 \cdot 100}{10}, \qquad (2.1)$$

где V – объем 0,1 н. раствора гидроксида натрия, израсходованный на титрование, см^3; K_1 – коэффициент поправки рабочего раствора гидроксида натрия; K_2 – коэффициент разбавления (если такое имеется); 100 – пересчет на 100 см^3 культуральной жидкости; 10 – объем пробы, взятой для анализа, см^3.

Остальную культуральную жидкость обрабатывают взвесью CaO_2 концентрацией 120 г/л. Для этого в 150 см^3 культуральной жидкости добавляют 15 см^3 взвеси CaO_2 при медленном нагревании до 60°С. Далее осадок отделяют центрифугированием в течение 20 мин при 5000 мин$^{-1}$. **Жидкость собирают в отдельную емкость!**

К осадку добавляют теплую дистиллированную воду в количестве 25 см^3 для промывки. Смесь тщательно перемешивают и отстаивают, затем снова центрифугируют; прозрачный раствор объединяют с фугатом, полученным на предыдущей стадии.

Полученный очищенный раствор лактата кальция направляют на упаривание под вакуумом для концентрирования и последующей кристаллизации. Объем концентрата, идущий на кристаллизацию, должен составлять не более 10% от первоначального объема.

Процесс кристаллизации длится в течение 12–18 ч при температуре 5–10°С. Кристаллы лактата отделяют центрифугированием, после чего сушат в сушильном шкафу.

Для определения выхода (Y, %) лактата от содержащихся сахаров в питательной среде кристаллы взвешивают и рассчитывают выход по следующей формуле

$$Y = \frac{m \cdot 10^5}{V \cdot c} \cdot 100\%, \qquad (2.2)$$

где m – масса кристаллов лактата кальция, г; V – объем культуральной жидкости, см^3; c – концентрация редуцирующих веществ в питательной среде, мг/100 см^3; 10^5 – перевод мг/100 см^3 в г/см^3.

Результат считается удовлетворительным, если содержание лактата в концентрате составило 10,0–15,5%.

Вопросы для самоконтроля

1. Какие микроорганизмы используют в промышленности в качестве продуцентов молочной кислоты?

2. Назовите отличия гомоферментативного молочнокислого брожения от гетероферментативного.

3. Какие питательные среды применяются для культур молочнокислых бактерий?

4. Опишите химизм гомоферментативного молочнокислого брожения.

5. Охарактеризуйте принципиальную технологическую схему получения молочной кислоты.

6. Сформулируйте цель данной лабораторной работы.

7. Как осуществляли подготовку молочной сыворотки?

8. Опишите методику получения посевного материала молочнокислых бактерий.

9. При каких условиях проводили молочнокислое брожение? Что такое редуцирующие вещества и каким методом определяли их количество в культуральной жидкости?

10. Каким образом проводили очистку молочной кислоты и получали ее кристаллы?

Раздел 3

УКСУСНОКИСЛОЕ БРОЖЕНИЕ

Уксуснокислое брожение – биохимический процесс окисления углеводов и этилового спирта в аэробных условиях до уксусной кислоты, осуществляемый уксуснокислыми бактериями.

Целенаправленное производство уксусной кислоты началось в конце XIV в. в районе Орлеана во Франции. Лишь в 1868 г. благодаря Л. Пастеру было подтверждено предположение, что уксуснокислое брожение является биологическим процессом с участием микроорганизмов. В 1879 г. Хансен выделил уксуснокислые бактерии, которые назвал *Bacterium aceti* и *B. pasteurianum*. В настоящее время они относятся к роду *Acetobacter*.

На сегодняшний день уксусную кислоту или уксус широко используют в пищевой, косметической и химической отраслях промышленности. Уксус, полученный микробиологическим путем, различается по сортам в зависимости от характера сбраживаемого субстрата. Из товарных форм уксусной кислоты известны столовый уксус (6%-ный и 9%-ный), чистая пищевая (70–80%), чистая уксусная (70–80%), безводная или ледяная (98,0–99,8%). Кроме перечисленных товарных форм, в кулинарии широко используют фруктовый уксус. Фруктовый уксус отличается от обычного уникальностью свойств, которые обусловлены набором компонентов: в него практически без потерь переходят полезные вещества из сырья (макро- и микроэлементы, витамины, ферменты, аминокислоты, уксусная, пропионовая, молочная, лимонная и другие кислоты).

Уксуснокислые бактерии – это представители семейства *Acetobacteriaceae*, родов *Acetobacter* и *Gluconobacter*. Они представляют собой полиморфные грамотрицательные палочки (длинные, короткие, ветвящиеся), являются мезофилами, строгими аэробами (развиваются только на поверхности сред) и хемоорганотрофами – получают энергию за счет окисления спирта до уксусного альдегида, а затем до уксусной кислоты либо получают энергию за счет окисления различных сахаров. Как правило, оптимальная температура для развития данных бактерий составляет 30°С, оптимальный уровень pH – 3,0–4,0. Однако избыток уксусной кислоты в сбраживаемой среде угнетает жизнедеятельность бактерий-продуцентов. После

накопления около 8% уксусной кислоты развитие бактерий замедляется и при содержании 12–14% полностью прекращается. Для сохранения естественной чистоты бактериальной популяции оптимальной считается концентрация кислоты около 10%. Интенсивность кислотообразования является штаммовым признаком и колеблется в довольно широких пределах.

Отличительной чертой уксуснокислых бактерий является способность к запасанию энергии за счет процессов неполного окисления ряда органических соединений, что приводит к накоплению в среде уксусной, глюконовой, в меньших количествах фумаровой, молочной и других кетокислот.

При уксуснокислом брожении реакция окисления этанола протекает в две стадии: сначала из этанола образуется уксусный альдегид, который затем с помощью соответствующих дегидрогеназ окисляется в уксусную кислоту:

$$C_2H_5OH + 1/2O_2 \rightarrow CH_3COH + H_2O;$$

$$CH_3COH + 1/2O_2 \rightarrow CH_3COOH.$$

Теоретически с 1 г глюкозы можно получить 0,51 г этилового спирта, при окислении которого образуется 0,67 г уксусной кислоты, но практический выход составляет примерно 0,5 г вследствие потерь легко испаряющихся веществ и частичного окисления уксусной кислоты с образованием CO_2. Кроме того, наряду с уксусной кислотой могут синтезироваться в небольших количествах альдегиды, эфиры и ацетоин.

Некоторые виды уксуснокислых бактерий могут вызывать и другие типы брожений. В промышленности применяется *Gluonobacter suboxidans* – возбудитель сорбозного брожения, при котором D-сорбит превращается в L-сорбозу. Сорбит получают из декстрозы химическим путем. Затем *G. suboxidans* осуществляют биологическое дегидрирование субстрата с образованием сорбозы, которая в дальнейшем используется для получения витамина С. Бактерии рода *Gluconobacter* используются также в производстве для получения глюконовой кислоты.

В настоящее время описано около 20 видов ацетобактерий, важнейшими из представителей являются: *A. aceti*, *A. pasterianum*, *A. Orleanense*, *A. xylinum*, *A. achutzenbachii*, *G. oxydans*. Большинство представителей уксуснокислых бактерий весьма требовательны к субстратам для роста. Почти все нуждаются в отдельных витаминах, в первую очередь в пантотеновой кислоте, однако встречаются бактерии, способные к синтезу всех необходимых факторов роста.

Можно выделить ряд требований, выдвигаемых к промышленным штаммам уксуснокислых бактерий:

– устойчивость к высокой концентрации уксусной кислоты;
– неспособность осуществлять переокисление уксуса;
– высокая скорость роста и образования уксусной кислоты.

В настоящее время сырьем для современных способов быстрого уксусного брожения служит спирт, который обычно поступает из спиртовой промышленности (картофельный или зерновой), однако может применяться и синтетический этиловый спирт. Этанол используется в виде водного раствора с концентрацией 4–11% об. Качество используемой воды для разбавления этанола, а также состав питательной среды могут заметно сказываться на активности синтеза уксусной кислоты. Высокое количество ионов меди, железа, олова, цинка существенно замедляют синтез.

На некоторых производствах в качестве альтернативного сырья для получения пищевого уксуса применяют виноградное вино, пивное сусло, мед, соки различных фруктов и ягод после спиртового брожения. Помимо углеродной составляющей, в питательную среду вводят уксусную кислоту и минеральные соли – источники N, P, S, Mn, K. Иногда добавляют источники витаминов в виде различных экстрактов.

Промышленное производство уксусной кислоты включает следующие технологические стадии:

- получение посевного материала;
- подготовка питательной среды;
- уксуснокислое брожение;
- концентрация и розлив готового продукта.

Известен немецкий (быстрый) способ производства уксусной кислоты. Он может быть непрерывным и периодическим, при котором окисление спирта происходит в особых генераторах или чанах, заполненных буковыми стружками, древесным углем, коксом или другими субстратами, на которых культивируются уксуснокислые бактерии. В верхней секции генераторов размещено распылительное устройство для разбрызгивания 3–10% водного раствора этанола, в средней – наполнитель для создания хорошо аэрируемой поверхности, в нижней собирается уксусная кислота. Большая поверхность стружек создает для бактерий хорошие условия аэрации. Перед началом процесса стружки пропитывают уксусной кислотой, затем в них вносят затор (питательную среду), приготовленный из 6%-ного уксуса и 3%-ного этилового спирта. Затор, окисляясь, одновременно

фильтруется через эти же буковые стружки. После окисления получают уксус, содержащий 9–15%-ную уксусную кислоту. При непрерывном производстве ежедневно полученную уксусную кислоту делят на две неравные части: 2/3 ее идет на приготовление нового затора и 1/3 – на расфасовку.

В современных промышленных условиях уксуснокислое брожение также осуществляют непрерывным способом при глубинном проточном культивировании уксуснокислых бактерий в батарее последовательно соединенных аппаратов емкостью 6 $м^3$ каждый. Поддержание асептических условий в процессе культивирования создает некоторые затруднения для повсеместного использования такого способа культивирования. При данном способе наилучшим сырьем для уксуснокислых бактерий является этиловый спирт, полученный из зернокартофельного сырья. Исходная среда должна содержать 4,0% этанола, 1,5% уксусной кислоты и минеральных солей (моногидрофосфат аммония, дигидрофосфат калия, магния сульфат), которая непрерывно поступает в первый ферментатор, а далее в последующих ферментаторах обогащается спиртом. В таких условиях выход уксусной кислоты достигает 30 кг/($м^3$·сут), что соответствует примерно 85 кг из 100 л безводного спирта.

Перед розливом полученную 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.

Лабораторная работа № 6
ПОЛУЧЕНИЕ УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ СПОСОБОМ

Цель работы: освоить технологию получения уксусной кислоты глубинным культивированием продуцентов и методы ее количественного и качественного определения в культуральной жидкости.

Реактивы, материалы и оборудование: двухзамещенный фосфат аммония, однозамещенный фосфат калия, сульфат магния, дрожжевой экстракт, этанол, флуконазол, 10%-ный раствор гидрокарбоната натрия, 10%-ный раствор хлорида железа (III), 0,1 н. раствор гидроксида натрия, уксуснокислые бактерии, спиртовой раствор фенолфталеина,

чашки Петри, колбы объемом 250 см^3, бюретка, термостат, шейкер-инкубатор.

Порядок выполнения работы. 1. Приготовление питательной среды. 2. Получение посевного материала. 3. Ферментация и получение уксусной кислоты. 4. Анализ культуральной жидкости.

1. Приготовление питательной среды

Сырьем для производства уксусной кислоты служит этиловый спирт, добавляемый в качестве субстрата к синтетической среде Лойцянской следующего состава (%): двухзамещенный фосфат аммония – 1,2; однозамещенный фосфат калия – 1,2; сульфат магния – 0,6; дрожжевой экстракт – 0,2. В готовую стерильную среду по заданию преподавателя добавляют спирт этиловый в количестве от 1 до 4%.

При получении жидкой питательной среды (120 см^3) для предотвращения образования осадка все компоненты растворяют и стерилизуют отдельно кипячением на водяной бане в течение не менее 30 мин либо автоклавированием при 0,1 МПа в течение 15 мин, затем сливают в общей стерильной таре. **Готовую среду стерилизуют без этилового спирта!**

Для получения плотной питательной среды используют в качестве основы жидкую, в которую добавляют водный агар, содержащий 0,5% мела, в пропорции 0,8 : 3,0, а также этиловый спирт в количестве 1–2%.

2. Получение посевного материала

Посевной материал в виде чистой культуры уксуснокислых бактерий рода *Acetobacter* выращивают на плотной агаризованной среде Лойцянской в чашках Петри в течение не менее 72 ч при температуре 30°С. **Для ферментации отбирают лишь те колонии, вокруг которых в процессе роста образовалась прозрачная зона!**

3. Ферментация и получение уксусной кислоты

Для проведения ферментации в две стерильные колбы общим объемом 250 см^3 добавляют 40 см^3 жидкой питательной среды Лойцянской, необходимое количество этилового спирта (задано преподавателем) и антибиотик – флуконазол (исходя из рекомендованной производителем дозировки). Засев колб осуществляют микробиологической петлей, предварительно сняв значительное количество биомассы.

Посевы инкубируют в течение 5 сут (при более длительной инкубации в среду необходимо добавлять этанол) на шейкере-инкубаторе в условиях интенсивной аэрации (220 мин$^{-1}$) при температуре 25–30°С. По прошествии необходимого для процесса ферментации времени полученную культуральную жидкость осветляют центрифугированием в течение 15 мин при 5000 мин$^{-1}$.

4. Анализ культуральной жидкости

Для проведение качественной реакции на наличие уксусной кислоты отбирают 10 см^3 осветленной культуральной жидкости и нейтрализуют 10%-ным раствором гидрокарбоната натрия (до появления устойчивой бледно-розовой окраски). Далее в раствор добавляют 0,5–1,0 см^3 10%-ного раствора хлорида железа (III) и смесь медленно прогревают над пламенем спиртовки. Аналогично готовят пробирку сравнения, содержащую вместо культуральной жидкости дистиллированную воду. При наличии уксусной кислоты раствор приобретает красно-бурое окрашивание из-за образования ацетата железа (III).

В случае положительной реакции в оставшейся осветленной культуральной жидкости определяют общую кислотность (X, %). Для этого проводят титрование 20 см^3 культуральной жидкости раствором 0,1 н. гидроксида натрия в присутствии фенолфталеина:

$$X = \frac{0{,}006 \cdot V \cdot K}{20} \cdot 100\%,$$

где 0,006 – количество уксусной кислоты, соответствующее 1 см^3 0,1 н. раствора NaOH, г; V – объем 0,1 н. раствора гидроксида натрия, израсходованный на титрование, см^3; K – коэффициент поправки рабочего раствора гидроксида натрия; 20 – объем пробы, взятый для титрования, см^3.

Хорошим считается результат, превышающий 5%.

Вопросы для самоконтроля

1. Назовите товарные формы уксусной кислоты.

2. Приведите характеристику продуцентов уксусной кислоты. Какие требования предъявляются к промышленным штаммам?

3. Опишите химизм окисления этанола при уксуснокислом брожении.

4. Какие компоненты необходимо добавлять в питательные среды для нормального развития уксуснокислых микроорганизмов? Какие компоненты негативно влияют на их культивирование?

5. Охарактеризуйте промышленные способы получения уксусной кислоты.

6. Сформулируйте цель данной лабораторной работы.

7. Опишите состав и способ приготовления синтетической среды Лойцянской.

8. Каким образом осуществляли ферментацию?

9. Опишите методику качественной реакции на уксусную кислоту.

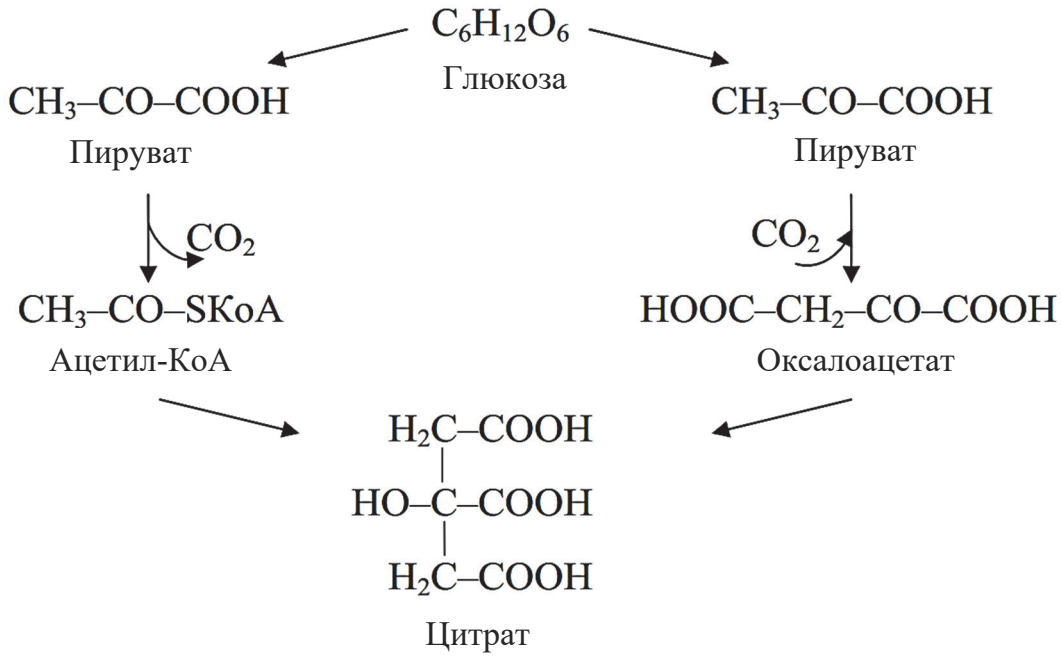
10. Как определяли содержание уксусной кислоты в культуральной жидкости?

Раздел 4

ЛИМОННОКИСЛОЕ БРОЖЕНИЕ

Микробиологическим синтезом получают различные органические кислоты: лимонную, уксусную, итаконовую, молочную, глюконовую, янтарную и др. В наибольших масштабах в мировой практике производят лимонную кислоту, которая широко применяется в пищевой, фармацевтической, текстильной (при окраске тканей) и химической отраслях промышленности. Способность к образованию лимонной кислоты на углеводных средах широко распространена среди мицелиальных грибов. Чаще всего в качестве продуцента в промышленных условиях используют мутантные штаммы гриба *Aspergillus niger*, дающие выход лимонной кислоты порядка 98% от потребляемых сахаров (при начальном содержании сахаров в среде около 12–16%).

Биосинтез лимонной кислоты связан с функционированием цикла Кребса (рисунок): лимонная кислота образуется в результате конденсации оксалоацетата и ацетил-КоА в присутствии цитратсинтазы. Необходимые для реакции оксалоацетат и ацетил-КоА образуются из двух молекул пирувата, одна из которых подвергается декарбоксилированию с образованием ацетил-КоА, вторая – карбоксилируется, образуя оксалоацетат.



Биосинтез лимонной кислоты

Сверхсинтез лимонной кислоты мицелиальными грибами обеспечивается лимитированием роста грибов одним или несколькими минеральными компонентами среды (Fe, Mn, N, P), избыточным содержанием источника углерода и низкой величиной pH ферментационной среды. Гриб прекращает рост после полного поглощения из среды дефицитного элемента, но продолжает потреблять имеющийся в среде источник углерода. На начальных стадиях лимонная кислота, которая не может метаболизироваться в цикле трикарбоновых кислот из-за ингибирования ряда ферментов (аконитазы, изоцитратдегидрогеназы и др.), накапливается в клетках гриба и затем выделяется в окружающую среду.

Посевной материал *Aspergillus niger* получают в виде конидий. В производственных условиях посевной материал накапливают в кюветах площадью 10–12 дм^2 на агаризованной среде следующего состава: пивное сусло, разбавленное до 7% по сахарометру; 1–2% NaCl; 0,1% мочевины; 0,001% $CuSO_4$; 2–3% агара.

При производстве лимонной кислоты применяют поверхностное или глубинное культивирование гриба-продуцента на мелассной питательной среде. Однако меласса содержит большое количество микроэлементов (прежде всего железа), которые затормаживают кислотообразование. Поэтому мелассу обрабатывают желтой кровяной солью $K_4[Fe(CN)_6]$ при кипячении раствора в течение часа. В результате соли железа и других тяжелых элементов осаждаются и удаляются из раствора, раствор стерилизуется. Максимальный рост мицелия гриба достигается на 4 сут культивирования.

Мицелий гриба в виде прочной пленки покрывает всю поверхность раствора. В процессе ферментации происходит постепенное повышение общей кислотности. Начальное значение уровня pH среды составляет, как правило, 6,8–7,0, в течение первых 3 сут ферментации снижается до 4,5, а к концу процесса – до 3,0. Максимальная активность кислотообразования пленки гриба наблюдается на 5–6-е сут (около 100 г кислоты на 1 м^2 пленки в час) и далее сохраняется на высоком уровне (50–60 г/(м^2·ч)).

Ферментацию прекращают при остаточном содержании сахара в растворе 1–2%. Общая кислотность ферментационного раствора достигает 20%.

Кроме лимонной кислоты, в культуральной жидкости присутствуют в значительно меньших количествах глюконовая, щавелевая и некоторые другие кислоты. На долю лимонной кислоты приходится

90–98% от всех органических кислот в растворе. Нормальным считается выход лимонной кислоты, составляющий 68–80% в пересчете на сахарозу в среде. После слива культуральной жидкости под пленку гриба для промывки подают горячую воду. Кислую промывную воду присоединяют к основному раствору. Мицелий после высушивания используют в качестве кормовой добавки.

При глубинном способе культивирования продуцентов лимонной кислоты применяют специально отселекционированные природные штаммы или мутанты *Aspergillus niger*. Штаммы, используемые в качестве продуцентов при поверхностном культивировании, непригодны. Однако, несмотря на общие преимущества глубинного способа, производство лимонной кислоты поверхностным культивированием продуцента является более экономичным: энергетические затраты и себестоимость продукта значительно ниже. На практике в промышленном производстве лимонной кислоты применяют оба метода.

Лабораторная работа № 7
КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ГРИБА С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ

Цель работы: вырастить продуцент лимонной кислоты поверхностным способом и проанализировать культуральную жидкость на содержание органических кислот.

Реактивы, материалы и оборудование: меласса, сахароза, глюкоза, 10%-ный раствор желтой кровяной соли, 5%-ный и 1%-ный растворы хлорида аммония, 1%-ный раствор дигидрофосфата калия, 11,1%-ный раствор хлорида кальция, 1 н. раствор гидрокарбоната натрия, 1%-ный раствор сульфата цинка, оксалат аммония, 0,25 н. раствор гидроксида натрия, 0,1 н. раствор перманганата калия, 10%-ный раствор соляной кислоты, 10%-ный раствор серной кислоты, продуценты лимонной кислоты, химический стакан объемом 500–1000 см^3, ареометр Баллинга (сахоромер), вакуум-фильтр, термостат.

Порядок выполнения работы. 1. Приготовление и засев питательной среды 2. Отделение культуральной жидкости от биопленки. 3. Определение общей кислотности культуральной жидкости. 4. Анализ содержания лимонной, щавелевой и глюконовой кислот. 5. Определение сухой массы мицелия и расчет его продуцирующей способности по лимонной кислоте.

1. Приготовление и засев питательной среды

Для поверхностного культивирования гриба *Aspergillus niger* в лабораторных условиях применяют высокие цилиндрические стаканы вместимостью 500–1000 см^3. Размер стакана должен быть таким, чтобы среда объемом 350–400 см^3 занимала по высоте примерно 10 см, т. е. площадь стакана должна быть 0,004 м^2.

Для культивирования гриба *Aspergillus niger* используют один из вариантов питательной среды (400 см^3), представленных в таблице. Мелассу исходя из варианта среды разбавляют 200–300 см^3 горячей воды, устанавливают содержание углеводов с помощью сахарометра и кипятят в течение 10 мин. Далее определяют pH раствора и при необходимости корректируют до величины 6,8–7,2.

В мелассный раствор в соответствии с вариантом вносят навеску сахарозы или глюкозы, раствор тщательно перемешивают и доводят до 400 см^3. В вариантах 5 и 8 навеску сахарозы растворяют в горячей воде и объем раствора доводят до 400 см^3. В приготовленный раствор вносят добавки питательных солей: 10%-ный раствор $K_4[FeCN_6]$ и 2,1 см^3 смеси 1%-ных растворов NH_4Cl, KH_2PO_4 и $ZnSO_4$, взятых в соотношении 1 : 1 : 1.

Состав питательных сред для культивирования гриба *Aspergillus niger*

Номер варианта	Содержание источника углерода в среде, %			Количество 10%-ного раствора $K_4[FeCN_6]$, см^3
	сахароза мелассы	сахароза	глюкоза	
1	17,0	–	–	5,00
2	13,6	3,4	–	4,00
3	8,5	8,5	–	2,25
4	3,4	13,6	–	1,00
5	–	17,0	–	0,25
6	13,6	–	3,4	4,00
7	8,5	–	8,5	2,25
8	–	–	17,0	0,25

Готовую питательную среду кипятят в стакане 10–15 мин, затем стакан закрывают и автоклавируют при температуре 120°C в течение 30 мин.

Стерильную питательную среду засевают споровым материалом или суспензией конидий, полученной смывом с поверхности скошенной агаризованной среды, с соблюдением условий асептики и инкубируют при температуре 32–34°C в течение 7–8 сут.

В первые 2–3 сут культивирования на поверхности раствора образуется складчатая пленка, покрытая беловато-серым пушком. На 6–7-е сут наблюдается спорообразование и поверхность пленки покрывается конидиями черного цвета.

2. Отделение культуральной жидкости от биопленки

Сброженный раствор сливают из-под биопленки в мерный цилиндр вместимостью 500 см^3. Затем биопленки переворачивают и дважды промывают 30–35 см^3 кипящей воды, присоединяя промывные воды к сброженному раствору. После замеряют общий объем жидкости и проводят с ней дальнейшие анализы.

Промытую пленку используют для определения абсолютно сухой массы мицелия гриба гравиметрическим методом (п. 5).

3. Определение общей кислотности культуральной жидкости

Отбирают 5 см^3 сброженного раствора, разбавляют его дистиллированной водой до объема 150 см^3, добавляют 3–4 капли фенолфталеина и титруют 0,25 н. раствором гидроксида натрия. Концентрация кислот в пересчете на лимонную кислоту (X, %) рассчитывается по формуле

$$X = \frac{F \cdot A}{5} \cdot 100\%, \qquad (4.1)$$

где A – количество 0,25 н. раствора гидроксида натрия, пошедшего на титрование, см^3; F – фактор щелочи по лимонной кислоте (F = 0,0175 при использовании 0,25 н. раствора гидроксида натрия), г; 5 – объем анализируемой пробы, см^3.

Общее содержание кислот ($C_к$, г) в пересчете на лимонную кислоту рассчитывают по формуле

$$C_к = \frac{F \cdot A \cdot V}{5}, \qquad (4.2)$$

где V – общий объем сброженной жидкости, см^3.

Зная количество кислоты в сброженном растворе, определяют съем кислоты (граммы) с 1 м^2 площади грибной пленки за одни стуки процесса ($C_{уд}$, г/(м^2·сут)) по формуле

$$C_{уд} = \frac{C_к}{S \cdot n}, \qquad (4.3)$$

где S – площадь дна стакана, м^2; n – длительность культивирования, сут.

4. Анализ содержания лимонной, щавелевой и глюконовой кислот

Отдельное определение кислот основано на различной растворимости их кальцевых солей в воде и слабокислом растворе. Цитрат кальция очень слаборастворим в горячей воде и хорошо растворим в разбавленном растворе соляной кислоты. Оксалат кальция практически не растворим ни в воде, ни в слабом растворе соляной кислоты. Глюконат кальция хорошо растворим в воде.

4.1. Определение суммы лимонной и щавелевой кислот

Для анализа берут такое количество раствора, чтобы в нем содержалось не менее 1 г и не более 2 г кислот. Приливают 11,1%-ный раствор хлористого кальция так, чтобы на каждый 1 г содержащихся кислот приходилось не менее 9 $см^3$ раствора хлористого кальция. Практически берут полуторный избыток (~14 $см^3$).

Раствор нагревают до кипения, нейтрализуют 10%-ным раствором аммиака, кипятят 10 мин и оставляют на водяной бане еще на 30 мин. Образовавшиеся цитрат и оксалат кальция выпадают в осадок, а глюконат кальция остается в растворе.

Горячий раствор фильтруют и осадок промываю 40 $см^3$ горячей воды для удаления ионов хлора. Учитывая, что растворимость цитрата кальция в горячей воде составляет около 0,055% в пересчете на лимонную кислоту, объем фильтрата и промывных вод замеряют и вносят соответствующую поправку при расчетах результатов анализа.

Осадок цитрата и оксалата растворяют в 10%-ной соляной кислоте. Раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$, объем доводят до метки дистиллированной водой и после перемешивания отбирают 100 $см^3$ раствора в химический стакан. Раствор нагревают до кипения и осаждают кальций свежим насыщенным раствором оксалата аммония (15 $см^3$), нейтрализуя аммиаком. Далее раствор кипятят 10 мин, охлаждают до комнатной температуры и фильтруют. Осадок промывают 40 $см^3$ холодной дистиллированной воды, переносят в коническую колбу, растворяют в 10%-ной серной кислоте (25 $см^3$), нагревают до температуры 80°С и титруют 0,1 н. раствором перманганата калия до образования устойчивой в течение не менее 30 с розовой окраски.

Сумму лимонной и щавелевой кислот (X_1, %) рассчитывают так:

$$X_1 = \frac{(0,007 \cdot П_1 + V_1 \cdot 0,00055)}{Q_1} \cdot 100\%, \qquad (4.4)$$

где 0,007 – количество лимонной кислоты, которое соответствует 1 см^3 0,1 н. раствора перманганата калия, г; $П_1$ – объем раствора перманганата калия (в пересчете на 0,1 н.), который пошел на титрование, см^3; V_1 – общий объем фильтрата и промывных вод, см^3; Q_1 – объем раствора, взятого на анализ, см^3.

4.2. Определение щавелевой кислоты

Количество раствора для анализа и количество хлористого кальция берут такие же, как и для определения суммы лимонной и щавелевой кислот.

К опытному раствору прибавляют 11,1%-ный раствор хлористого кальция (~14 см^3/г кислот), кипятят 10 мин и оставляют на 30 мин на водяной бане (если осадка нет, выдерживают еще 1 ч). Охлажденный раствор фильтруют. Осадок промывают 50 см^3 холодной воды, переносят в коническую колбу, растворяют в 10 %-ной серной кислоте, затем нагревают до температуры 80°С и тируют 0,1 н. раствором перманганата калия.

Содержание щавелевой кислоты (X_2, %) рассчитывают по формуле

$$X_2 = \frac{0,007 \cdot П_2}{Q_2} \cdot 100\%, \qquad (4.5)$$

где $П_2$ – объем раствора перманганата калия, который пошел на титрование, см^3; Q_2 – объем раствора, взятого на анализ, см^3.

Содержание лимонной кислоты (X_3, %) рассчитывают по формуле

$$X_3 = X_1 - X_2. \qquad (4.6)$$

Количество лимонной кислоты во всем растворе (C, г) составляет

$$C = \frac{V \cdot X_3}{100\%}, \qquad (4.7)$$

где V – общий объем культуральной жидкости, см^3 (п. 3).

4.3. Определение глюконовой кислоты

Для анализа берут объем раствора, аналогичный тому, который использовался для определения суммы лимонной и щавелевой кислот. Добавляют углекислый кальций из расчета 0,78 г на 1 г лимонной кислоты, определяемой по общей кислотности. После осаждения пены раствор кипятят 10 мин и контролируют полноту реакции по индикаторной

бумаге (pH 7,0). В случае кислой реакции раствор кипятят еще 10 мин, а если этого недостаточно, то добавляют еще немного углекислого кальция и снова кипятят, пока раствор не приобретет нейтральный pH. Затем вносят 1–2 см^3 5%-ного хлорида аммония и ставят на 30 мин на водяную баню. Цитрат и оксалат кальция выпадают в осадок, вместе с которым осаждается избыток кальция в виде мела. В растворе остается глюконовокислый кальций и небольшое количество цитрата кальция (так как он слабо растворим в воде). Горячий раствор фильтруют, осадок отмывают горячей дистиллированной водой (50 см^3).

Глюконовую кислоту в фильтрате определяют по кальцию, вычитая кальций, связанный с лимонной кислотой. Объем фильтрата и промывных вод замеряют и вносят поправки на растворимость цитрата кальция. Затем раствор нагревают до кипения и осаждают кальций кипящим насыщенным раствором щавелевокислого аммония (15 см^3). Раствор кипятят 10 мин, охлаждают и фильтруют. Осадок промывают дистиллированной водой, после растворяют в 25 см^3 10%-ной серной кислоты, нагревают до 80°С и тируют 0,1 н. раствором перманганата калия.

Содержание глюконовой кислоты (X_4, %) эквивалентно количеству лимонной кислоты. Его рассчитывают по формуле

$$X_4 = \frac{(0{,}007 \cdot \Pi_3 + V_2 \cdot 0{,}00055)}{Q_3} \cdot 100\%, \qquad (4.8)$$

где 0,007 – количество лимонной кислоты, которое соответствует 1 см^3 0,1 н. раствора перманганата калия, г; $П_3$ – объем раствора перманганата калия (в пересчете на 0,1 н.), который пошел на титрование, см^3; V_2 – общий объем фильтрата и промывных вод, см^3; Q_3 – объем раствора, взятого на анализ, см^3.

Общее количество трех кислот (в пересчете на лимонную кислоту) должно соответствовать общей кислотности, которая определена в культуральной жидкости (п. 3). Однако следует учитывать, что в мелассных растворах, кроме свободных кислот, содержатся их кальциевые соли, поэтому сумма трех кислот по анализу обычно превышает общую титруемую кислотность.

5. Определение сухой массы мицелия и расчет его продуцирующей способности по лимонной кислоте

Пленку гриба, оставшуюся в стакане, не нарушая ее целостности, переносят на воронку Бюхнера с бумажным фильтром известной массы и включают вакуумный насос. Сверху пленку прикрывают двумя

бумажными фильтрами и подсушивают под вакуумом 10–15 мин. Затем биопленку помещают в чашку Петри, накрывают свежим фильтром и высушивают в сушильном шкафу до постоянной массы.

По абсолютно сухой массе мицелия ($Б_м$, г) рассчитывают его продуцирующую способность (ПС, г/г) по формуле

$$ПС = \frac{C}{Б_м}, \quad (4.9)$$

где C – количество лимонной кислоты в растворе, г (п. 4.2).

В 400 см^3 исходной питательной среды содержится 17%, или $0{,}17 \cdot 400 = 68$ г сахаров. Выход лимонной кислоты от сахаров среды (G, %) рассчитывают по формуле

$$G = \frac{C}{68} \cdot 100\%. \quad (4.10)$$

Вопросы для самоконтроля

1. Приведите характеристику продуцентов органических кислот.
2. Опишите биосинтез лимонной кислоты. За счет чего осуществляется сверхсинтез? Как это реализуется на практике?
3. Какие способы культивирования могут быть использованы для получения лимонной кислоты?
4. Охарактеризуйте мелассу как основу для приготовления питательной среды при производстве органических кислот.
5. Сформулируйте цель данной лабораторной работы.
6. Каким образом осуществляли приготовление питательной среды и ее засев?
7. Как вычисляли общую кислотность сброженного раствора?
8. Какие особенности получаемых кислот позволяют осуществить их количественную оценку?
9. Опишите методику определения содержания лимонной и щавелевой кислот в культуральной жидкости.
10. Опишите методику определения содержания глюконовой кислоты в культуральной жидкости.
11. Как проводили определение сухой массы мицелия и расчет его продуцирующей способности по лимонной кислоте?

Раздел 5

ПРОПИОНОВОКИСЛОЕ БРОЖЕНИЕ

Пропионовая кислота (CH_3CH_2COOH) синтезируется пропионовокислыми бактериями (*Propionibacterium*), представляющими собой грамположительные, бесспоровые, неподвижные палочки, склонные к полиморфизму. Клетки расположены единично, парами или короткими цепочками. Некоторые виды характеризуются утолщениями и веточками на концах.

Пропионовокислые бактерии расщепляют углеводы по гликолитическому пути до пировиноградной кислоты, которая подвергается дальнейшим превращениям с образованием пропионовой кислоты, уксусной кислоты и CO_2:

$$1{,}5C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CH_2COOH + CH_3COOH + CO_2 + H_2O.$$

Поскольку пропионовокислые бактерии развиваются, как правило, в тех же субстратах, что и молочнокислые, то предпочтительным субстратом для окисления является молочная кислота, синтезирующаяся в результате молочнокислого брожения.

Существуют два метаболических пути образования пропионовой кислоты у пропионовокислых бактерий:

– акрилатный путь, в котором лактат в ходе ряда последовательных реакций восстанавливается до пропионата;

– сукцинат-пропионатный путь, в котором лактат превращается в пропионат через стадии образования пирувата и сукцината.

Акрилатный путь свойственен только нескольким видам микроорганизмов (*Clostridium propionicum*, *Bacteroides ruminicola*, *Megasphaera elsdenii*).

Химизм образования пропионовой кислоты по сукцинат-пропионатному пути (рисунок, с. 70) заключается в следующем: пировиноградная кислота при участии пируваткарбоксилазы (Ф1) карбоксилируется в щавелевоуксусную, которая восстанавливается с помощью малатдегидрогеназы (Ф2) до яблочной с ее последующей дегидратацией фумаратгидратазой (Ф3) до фумаровой кислоты. Затем фумарат восстанавливается до янтарной кислоты под действием сукцинатдегидрогеназы (Ф4). Далее из сукцината через образование сукцинил-КоА с участием сукцинил-КоА-синтетаза (Ф5), после вступающий в реакцию изомеризации с помощью метилмалонил-КоА-мутазы (Ф6), образуется

метилмалонил-КоА. Последний за счет декарбоксилирования преобразуется в пропионил-КоА с помощью метилмалонил-КоА-декарбоксилаза (Ф7), из которого в итоге образуется пропионат с участием пропионат-КоА-трансферазы (Ф8).

Сукцинат-пропионатный путь образования пирувата

Таким образом, из трех молекул глюкозы образуется 4 молекулы пропионовой кислоты, 2 молекулы уксусной кислоты, 2 молекулы углекислого газа и 2 молекулы воды.

От других типов брожения пропионовокислое отличается высоким выходом АТФ: 1,5 М глюкозы могут дать пропионовокислым бактериям около 6 М АТФ.

Среди промышленных штаммов-продуцентов пропионовой кислоты известны *Pr. arabinosum*, *Pr. shermanii*, *Pr. rubrum* и др. Наиболее перспективными из них оказались: *Pr. freudenreichii* и *Pr. Acidipropionici*.

Промышленно пропионовую кислоту получают в глубинной аэробной культуре на средах, содержащих: углевод – 1–2%; сульфат аммония – 0,3%; гидолфосфат калия – 0,2%; хлорид кобальта – 0,0001%; биотин – 0,00001%; пантоненат – 0,1%; тиамин – 0,01%. Более простая среда для лабораторного получения пропионовой кислоты состоит: глюкоза – 2%; дрожжевой экстракт – 0,4%; соли молочной кислоты. Процесс культивирования пропионовокислых бактерий длится 12 сут при температуре 30°С и pH 6,8–7,2. При этом около 75% сброженного сахара превращается в пропионовую и уксусную кислоты (5 : 1), менее 20% расходуется на образование диоксида углерода. Конечные продукты ферментации (пропионат и ацетат) можно не разделять, поскольку обе кислоты обладают консервирующими свойствами.

Биосинтетическая пропионовая кислота применяется при производстве растворителей, пластификаторов, а также в пищевой и фармацевтической отраслях промышленности в качестве консерванта. Кроме этого, указанная кислота может использоваться как фунгицид для сохранения зерна.

Пропионовокислое брожение также применяется в сыроделии при созревании твердых сыров, которое длится 2–3 мес. Пропионовокислые бактерии превращают молочную кислоту в пропионовую и уксусную кислоты, придающие сыру острый вкус, а благодаря выделению углекислого газа в сырной массе образуются поры («глазки»). В связи с тем, что пропионовокислые бактерии способны накапливать в своих клетках большие количества витамина B_{12}, их также используют для его промышленного получения.

Лабораторная работа № 8
КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ С ПОЛУЧЕНИЕМ ПРОПИОНОВОЙ КИСЛОТЫ

Цель работы: ознакомиться с особенностями культивирования пропионовокислых бактерий и оценить динамику накопления органических кислот в культуральной жидкости.

Реактивы, материалы и оборудование: молочная сыворотка, магний хлористый, натрий лимоннокислый трехзамещенный, калий фосфорнокислый однозамещенный, аскорбиновая кислота, 2%-ная серная кислота, растворы I и II, глюкоза, пропионовокислые бактерии, чашки Петри, колбы вместимостью 50 $см^3$, цилиндр, эбулиостат, бюретка, центрифуга, термостат.

Порядок выполнения работы. 1. Приготовление питательной среды. 2. Подготовка посевного материала. 3. Культивирование пропионовокислых бактерий. 4. Оценка динамики накопления органических кислот в культуральной жидкости.

1. Приготовление питательной среды

Берут 150 см^3 молочной сыворотки, подогревают ее до температуры 45°С, выдерживают 10 мин и отделяют жир методом центрифугирования в течение 15 мин при 5000 мин$^{-1}$. Далее обезжиренную сыворотку подогревают до 95°С, выдерживают при данной температуре 15 мин с целью коагуляции белков и снова центрифугируют при тех же параметрах. После 100 см^3 подготовленной сыворотки обогащают согласно таблице и стерилизуют при 0,05 МПа в течение 30 мин либо кипячением в течение 60 мин.

Состав питательной среды для культивирования пропионовокислых бактерий

Компоненты	Количество, г
Сыворотка молочная осветленная	100,00
Магний хлористый	0,03
Натрий лимоннокислый трехзамещенный	0,10
Калий фосфорнокислый однозамещенный	0,05
Аскорбиновая кислота	0,01
Агар микробиологический (для плотной среды)	0,15

В оставшейся сыворотке эбулиостатическим методом определяют содержание сахаров в 100 см^3 (п. 2 ЛР № 2).

2. Подготовка посевного материала

Для получения пропионовой кислоты используют культуры бактерий рода *Propionibacterium* (*Propionibacterium freudenreichii*).

Сначала бактерии выращивают глубинным методом в чашках Петри с агаризованной питательной средой на протяжении 72 ч при температуре 30°С.

При глубинном посеве микроорганизмов в агаризованную питательную среду ее предварительно разливают по 15–20 см^3 в пробирки и стерилизуют. После охлаждения расплавленной среды до 48–50°С в пробирку стерильной пипеткой вносят по 0,5–1,0 см^3 жидкой культуры микроорганизмов. Содержимое пробирки перемешивают, вращая ее между ладонями, и быстро выливают в чашку Петри. После застывания среды чашку помещают в термостат.

3. Культивирование пропионовокислых бактерий

Берут жидкую питательную среду в количестве 75 $см^3$, разливают в равном количестве в три стерильные колбы объемом 50 $см^3$, т. е. по 25 $см^3$. В колбы вносят культуру бактерий-продуцентов, аккуратно выкалывая изолированные колонии стерильной микробиологической петлей, и инкубируют посевы при 30°С в течение 72 ч.

4. Оценка динамики накопления органических кислот в культуральной жидкости

Культуральную жидкость первой колбы после 24 ч культивирования осветляют путем центрифугирования в течение 15 мин при 5000 $мин^{-1}$. В осветленной сыворотке определяют остаточное количество сахаров в 100 $см^3$ (п. 2 ЛР № 2), а также общую кислотность (п. 3 ЛР № 7).

Количество сахаров, ассимилированных микроорганизмами (У, мг), рассчитывают по формуле

$$У = РВ_0 – РВ, \quad (5.1)$$

где $РВ_0$ – содержание редуцирующих веществ в 100 $см^3$ молочной сыворотки до сбраживания, мг; РВ – содержание редуцирующих веществ 100 $см^3$ молочной сыворотки после сбраживания, мг.

Аналогично анализируют вторую и третью колбы после 48 ч и 72 ч культивирования соответственно.

В виде таблицы оформляют полученные результаты и делают выводы.

Вопросы для самоконтроля

1. Приведите характеристику продуцентов пропионовой кислоты.
2. Опишите сукцинат-пропионатный путь получения пропионовой кислоты микроорганизмами.
3. В каких отраслях промышленности используется пропионовая кислота?
4. Опишите промышленный микробиологический способ получения пропионовой кислоты.
5. Сформулируйте цель данной лабораторной работы.
6. Как получали посевной материал и осуществляли культивирование пропионовокислых бактерий?
7. Каким образом оценивали динамику накопления органических кислот в культуральной жидкости?
8. Как определяли содержание редуцирующих веществ в питательной среде и культуральной жидкости?

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица П1

Плотность растворов этилового спирта при 20°С

Относительная плотность ρ_{20}	Концентрация		
	%	г/л	моль/л
0,9945	2	19,9	0,432
0,9910	4	39,6	0,860
0,9878	6	59,3	1,287
0,9848	8	78,8	1,710
0,9819	10	98,2	2,131
0,9791	12	117,5	2,550
0,9764	14	136,7	2,967
0,9739	16	155,8	3,382
0,9713	18	174,8	3,795
0,9686	20	193,7	4,205
0,9659	22	212,5	4,613
0,9631	24	231,1	5,017
0,9602	26	249,7	5,419
0,9571	28	268,0	5,817
0,9538	30	286,1	6,211
0,9504	32	304,1	6,602
0,9468	34	321,9	6,988
0,9431	36	339,5	7,370
0,9392	38	356,9	7,747
0,9352	40	374,1	8,120
0,9311	42	391,1	8,489
0,92685	44	407,8	8,852
0,9226	46	424,4	9,212
0,9182	48	440,7	9,567
0,9138	50	456,9	9,918
0,9094	52	472,9	10,265
0,9049	54	488,6	10,606
0,9003	56	504,2	10,944
0,8957	58	519,5	11,277
0,8911	60	534,7	11,606
0,8865	62	549,6	11,931
0,8818	64	564,4	12,250
0,8771	66	578,9	12,566
0,8724	68	593,2	12,877
0,8677	70	607,4	13,184

Окончание табл. П1

Относительная плотность ρ_{20}	Концентрация		
	%	г/л	моль/л
0,8629	72	621,3	13,486
0,8581	74	635,0	13,784
0,8532	76	648,4	14,075
0,84835	78	661,7	14,364
0,8434	80	674,7	14,646
0,8385	82	687,6	14,925
0,8335	84	700,1	15,198
0,8284	86	712,4	15,464
0,8232	88	724,4	15,725
0,8180	90	736,2	15,980
0,8126	92	747,6	16,228
0,80705	94	758,6	16,467
0,8014	96	769,3	16,700
0,7955	98	779,6	16,922
0,7893	100	789,3	17,133

Таблица П2

Физико-химические показатели пшеничного светлого и темного пива согласно СТБ 395-2017

Наименование показателя	Массовая доля сухих веществ в начальном сусле (экстрактивность начального сусла), %				
	11,0–11,9	12,0–12,9	13,0–13,9	14,0–14,9	15,0–15,9
Объемная доля спирта, %, не менее*	2,5	3,5	4,5	4,5	5,0
Кислотность, к. ед., не более	3,2				
pH	3,6–4,8				
Цвет, ц. ед.: для светлого пива	0,2–2,5				
для темного пива	> 0,5				
Массовая доля двуокиси углерода, %, не менее	0,3				
Пенообразование: высота пены, мм, не менее	30				
пеностойкость, мин, не менее	3				

*В технологической инструкции на пиво конкретного наименования устанавливается конкретное (целевое) значение объемной доли спирта. При этом допускаемое отклонение от объемной доли спирта составляет ±0,5%.

Таблица П3

Вычисление массовой доли экстрактивных веществ

Относительная плотность ρ_{20}	Массовая доля экстрактивных веществ, %	Относительная плотность ρ_{20}	Массовая доля экстрактивных веществ, %
1,0132	3,37	1,0206	5,23
1,0134	3,42	1,0208	5,28
1,0136	3,47	1,0210	5,33
1,0138	3,52	1,0212	5,38
1,014	3,57	1,0214	5,43
1,0142	3,62	1,0216	5,48
1,0144	3,67	1,0218	5,53
1,0146	3,73	1,0220	5,58
1,0148	3,78	1,0222	5,63
1,0150	3,83	1,0224	5,68
1,0152	3,88	1,0226	5,73
1,0154	3,93	1,0228	5,78
1,0156	3,98	1,0230	5,83
1,0158	4,03	1,0232	5,88
1,0160	4,08	1,0234	5,93
1,0162	4,13	1,0236	5,98
1,0164	4,18	1,0238	6,03
1,0166	4,23	1,0240	6,08
1,0168	4,28	1,0242	6,13
1,0170	4,33	1,0244	6,18
1,0172	4,33	1,0246	6,23
1,0174	4,43	1,0248	6,28
1,0176	4,48	1,0250	6,33
1,0178	4,53	1,0252	6,38
1,0180	4,58	1,0254	6,42
1,0182	4,63	1,0256	6,48
1,0184	4,68	1,0258	6,53
1,0186	4,73	1,0260	6,58
1,0188	4,78	1,0262	6,63
1,0190	4,83	1,0264	6,68
1,0192	4,88	1,0266	6,73
1,0194	4,93	1,0268	6,77
1,0196	4,98	1,0270	6,82
1,0198	5,03	1,0272	6,87
1,0200	5,08	1,0274	6,92
1,0202	5,13	1,0276	6,97
1,0204	5,18	1,0278	7,02

Окончание табл. П3

Относительная плотность ρ_{20}	Массовая доля экстрактивных веществ, %	Относительная плотность ρ_{20}	Массовая доля экстрактивных веществ, %
1,0280	7,07	1,0362	9,08
1,0282	7,12	1,0364	9,13
1,0284	7,17	1,0366	9,18
1,0286	7,22	1,0368	9,23
1,0288	7,27	1,0370	9,27
1,0290	7,32	1,0372	9,32
1,0292	7,37	1,0374	9,37
1,0294	7,42	1,0376	9,42
1,0296	7,46	1,0378	9,47
1,0298	7,51	1,0380	9,51
1,0300	7,56	1,0382	9,56
1,0302	7,61	1,0384	9,61
1,0304	7,66	1,0386	9,66
1,0306	7,71	1,0388	9,71
1,0308	7,76	1,0390	9,75
1,0310	7,81	1,0392	9,80
1,0312	7,86	1,0394	9,85
1,0314	7,91	1,0396	9,90
1,0316	7,96	1,0398	9,95
1,0318	8,01	1,0400	9,99
1,0320	8,06	1,0402	10,04
1,0322	8,11	1,0404	10,09
1,0324	8,16	1,0406	10,14
1,0326	8,21	1,0408	10,19
1,0328	8,26	1,0410	10,23
1,0330	8,29	1,0412	10,28
1,0332	8,34	1,0414	10,33
1,0334	8,39	1,0416	10,38
1,0336	8,44	1,0418	10,43
1,0338	8,49	1,0420	10,48
1,0340	8,54	1,0422	10,52
1,0342	8,59	1,0424	10,57
1,0344	8,64	1,0426	10,62
1,0346	8,69	1,0428	10,67
1,0348	8,74	1,0430	10,72
1,0350	8,78	1,0432	10,76
1,0352	8,83	1,0434	10,81
1,0354	8,88	1,0436	10,86
1,0356	8,93	1,0438	10,91
1,0358	8,98	1,0440	10,96
1,0360	9,03	1,0442	11,00

ЛИТЕРАТУРА

1. Ручай, Н. С. Биотехнология. Лабораторный практикум : учеб. пособие / Н. С. Ручай, Р. М. Маркевич, И. А. Гребенчикова. – Минск: БГТУ, 2005. – 167 с.

2. Пиво. Общие технические условия: СТБ 395-2017. – Введ. 29.06.2017. – Минск: Госстандарт Респ. Беларусь, 2017. – 23 с.

3. Продукция пивоваренная. Методы определения объемной доли этилового спирта, массовой доли действительного экстракта и расчет экстрактивности начального сусла: ГОСТ 12787–2021. – Введ. 10.11.21. – Минск: Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 2021. – 26 с.

4. Кислота молочная пищевая. Технические условия: ГОСТ 490–2006. – Введ. 24.06.06. – Минск: Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 2006. – 57 с.

5. Кислота лимонная моногидрат пищевая: ГОСТ 908–2004. – Введ. 26.05.04. – Минск: Госстандарт Респ. Беларусь, 2004. – 34 с.

6. Ковалевский, К. А. Технология бродильных производств: учеб. пособие / К. А. Ковалевский. – Киев: ИНКОС, 2004. – 340 с.

7. Соболева, Е. В. Основы технологии пищевых продуктов. Лабораторные работы: учеб.-метод. пособие / Е. В. Соболева, М. М. Данина. – СПб.: НИУ ИТМО: ИХиБТ, 2013. – 56 с.

8. Холькин, Ю. И. Технология гидролизных производств: учеб. для студентов вузов / Ю. И. Холькин. – М.: Лесная промышленность, 1989. – 496 с.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ 3

ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ 5

Раздел 1. СПИРТОВОЕ БРОЖЕНИЕ 10

1.1. Получение этилового спирта из крахмалосодержащего сырья 10

Лабораторная работа № 1. Сбраживание в этиловый спирт крахмалосодержащего сырья 17

1.2. Переработка молочной сыворотки для получения этилового спирта 21

Лабораторная работа № 2. Сбраживание молочной сыворотки для получения этилового спирта 25

1.3. Практическое значение спиртового брожения. Приготовление пивного сусла 30

Лабораторная работа № 3. Получение пивного сусла и оценка его качественных показателей 34

1.4. Оценка качественных показателей пива 38

Лабораторная работа № 4. Оценка качественных показателей готового пива 40

Раздел 2. МОЛОЧНОКИСЛОЕ БРОЖЕНИЕ 46

Лабораторная работа № 5. Культивирование молочнокислых бактерий с целью получения молочной кислоты 49

Раздел 3. УКСУСНОКИСЛОЕ БРОЖЕНИЕ 53

Лабораторная работа № 6. Получение уксусной кислоты микробиологическим способом 56

Раздел 4. ЛИМОННОКИСЛОЕ БРОЖЕНИЕ 60

Лабораторная работа № 7. Культивирование микроскопического гриба с целью получения лимонной кислоты 62

Раздел 5. ПРОПИОНОВОКИСЛОЕ БРОЖЕНИЕ 69

Лабораторная работа № 8. Культивирование пропионовокислых бактерий с получением пропионовой кислоты 71

ПРИЛОЖЕНИЕ 74

ЛИТЕРАТУРА 78

Учебное издание

Адамцевич Наталья Юрьевна
Сергиевич Денис Степанович
Тананайко Татьяна Михайловна

ТЕХНОЛОГИЯ ПРОДУКТОВ БРОЖЕНИЯ

Лабораторный практикум

Учебно-методическое пособие

Редактор *Е. И. Гоман*
Компьютерная верстка *Е. В. Ильченко*
Дизайн обложки *Д. А. Полешова*
Корректор *Е. И. Гоман*

Подписано в печать 25.03.2024. Формат 60×84 1/16.
Бумага офсетная. Гарнитура Таймс. Печать ризографическая.
Усл. печ. л. 4,7. Уч.-изд. л. 4,8.
Тираж 80 экз. Заказ .

Издатель и полиграфическое исполнение:
УО «Белорусский государственный технологический университет».
Свидетельство о государственной регистрации издателя,
изготовителя, распространителя печатных изданий
№ 1/227 от 20.03.2014.
Ул. Свердлова, 13а, 220006, г. Минск.