

ПИЩЕВАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

методические указания
по выполнению лабораторных работ

направление подготовки 19.03.01 – Биотехнология
(профиль Биотехнология)

Разумкова Г.М., Решетникова О.В.

www.scipro.ru

ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
ЛЕНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ
«ЛЕНИНГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени А.С. ПУШКИНА»

ЛУЖСКИЙ ИНСТИТУТ (ФИЛИАЛ)

ПИЩЕВАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

методические указания по выполнению лабораторных работ

**направление подготовки 19.03.01 – Биотехнология
(профиль Биотехнология)**

Разумкова Г.М., Решетникова О.В.

Луга
2023

УДК 664
ББК 36
DOI 10.54092/9785907607248

Главный редактор: Краснова Наталья Александровна – кандидат экономических наук, доцент,
руководитель НОО «Профессиональная наука»

Технический редактор: Канаева Ю.О.

Рецензенты:

Кулёв Д.Х. - докт. техн. наук, профессор кафедры биотехнологии, технологии производства и переработки сельскохозяйственной продукции Лужского института (филиала) ЛГУ им. А.С. Пушкина

Сбойчаков В.Б. - докт. мед. наук, профессор кафедры микробиологии Федерального государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего образования Министерства обороны Российской Федерации Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова

Составители:

Разумкова Г.М., Решетникова О.В.

Пищевая биотехнология. Методические указания по выполнению лабораторных работ. Направление 19.03.01 – Биотехнология (профиль Биотехнология) [Электронный ресурс]:– Эл. изд. – Электрон. текстовые дан. (1 файл pdf: 100 с.). – Разумкова Г.М., Решетникова О.В. 2023. – Режим доступа: http://scipro.ru/conf/FOOD_BIOTECHNOLOGY.pdf. Сист. требования: Adobe Reader; экран 10".

ISBN 978-5-907607-24-8

Методические указания предназначены для студентов, обучающихся по направлению 19.03.01 «Биотехнология» очной формы обучения. В методических указаниях представлены лабораторные работы по дисциплине «Пищевая биотехнология», техника безопасности при работе в биотехнологической лаборатории, контрольные вопросы по каждой лабораторной работе, задачи, список литературы, требования к оформлению лабораторных работ. Практикум составлен в соответствии с требованиями ФГОС ВО. Представленные материалы могут быть использованы для подготовки бакалавров на биотехнологическом факультете Лужского института (филиала) ЛГУ имени А.С. Пушкина.

ISBN 978-5-907607-24-8



© Разумкова Г.М., Решетникова О.В. 2023
© Ленинградский государственный университет
(ЛГУ) имени А.С. Пушкина, Лужский институт (филиал) 2023
© Оформление: издательство НОО Профессиональная наука, 2023

Содержание

Введение.....	5
Правила техники безопасности в лаборатории.....	6
Раздел 1. Продуценты молочнокислого брожения.....	8
<i>Лабораторная работа № 1. Продуценты молочнокислого брожения пищевой биотехнологии.....</i>	<i>8</i>
<i>Лабораторная работа № 2. Изучение биотехнологии кисломолочных напитков.....</i>	<i>13</i>
<i>Лабораторная работа № 3. Изучение биотехнологии производства творога.....</i>	<i>28</i>
<i>Лабораторная работа № 4. Изучение биотехнологических основ приготовления сыра.....</i>	<i>37</i>
Раздел 2. Продуценты спиртового брожения.....	44
<i>Лабораторная работа № 5. Спиртовое брожение, получение спирта при сбраживании углеводов дрожжами.....</i>	<i>44</i>
<i>Лабораторная работа № 6. Определение активности амилазы солода по методу Вольгемута.....</i>	<i>49</i>
<i>Лабораторная работа № 7. Технологическая схема производства кормовых дрожжей, их состав и качественные реакции.....</i>	<i>52</i>
<i>Лабораторная работа № 8. Изучение биотехнологии кваса.....</i>	<i>57</i>
Раздел 3. Ферментные препараты, используемые в пищевой биотехнологии.....	67
<i>Лабораторная работа № 9. Изучение стандартизации и способов стабилизации ферментных препаратов, применяемых в биотехнологических процессах.....</i>	<i>67</i>
<i>Лабораторная работа № 10. Определение амилалитической активности ферментных препаратов различного происхождения.....</i>	<i>70</i>
<i>Лабораторная работа № 11. Изучение цитолитических и протеолитических ферментных препаратов и методов определения их активности.....</i>	<i>75</i>
<i>Лабораторная работа № 12. Определение активности каталазы по Баху.....</i>	<i>78</i>
<i>Лабораторная работа № 13. Определение активности липазы ...</i>	<i>81</i>
Контрольные работы.....	86
Список литературы.....	90
Приложение.....	92

Введение

Пищевая биотехнология является одним из важнейших разделов биотехнологии. В течение тысячелетий люди успешно получали сыр, уксус, спиртные напитки и другие продукты, не зная о том, что в основе лежит метод микробиологической ферментации. С помощью пищевой биотехнологии в настоящее время получают такие пищевые продукты, как пиво, вино, спирт, хлеб, уксус, кисломолочные продукты, сырокопченые и сыровяленые мясные продукты, и многие другие. Кроме того, пищевая биотехнология используется для получения веществ и соединений, используемых в пищевой промышленности: это лимонная, молочная и другие органические кислоты; ферментные препараты различного действия – протеолитические, амилалитические, целлюлолитические, аминокислоты и другие пищевые и биологически активные добавки.

Важность пищевой биотехнологии для биотехнолога определяется тем, что использование микроорганизмов или ферментных препаратов, биотехнологических процессов при производстве пищевых продуктов оказывает существенное влияние на потребительские свойства и показатели качества продовольственных товаров. Знание о биотехнологических процессах позволит определить причины порчи продовольственных товаров и возникновения дефектов, приводящих к существенным количественным потерям товаров. Например, неправильное применение заквасок может привести к ухудшению качества и возникновению дефектов кисломолочной продукции. С другой стороны, использование новых штаммов микроорганизмов может придать продукту – пиву, вину и другим пищевым продуктам, – новые оригинальные оттенки вкуса и аромата. Применение ферментных препаратов и других соединений, полученных биотехнологическим способом, будет способствовать оптимизации и интенсификации технологических процессов производства пищевых продуктов, улучшению их свойств и продлению сроков хранения.

Методические указания отражают вопросы использования микроорганизмов или ферментных препаратов биотехнологических процессов при производстве пищевых продуктов.

Методические указания предназначены для студентов, обучающихся по направлению подготовки 19.03.01-Биотехнология. Представленные в методических указаниях практические и лабораторные работы, будут способствовать усвоению студентами материала по изучаемой дисциплине, практическому овладению техникой экспериментальных исследований, приобретению навыков работы с лабораторным оборудованием, проведению анализа полученных данных, формированию профессиональных компетенций.

Правила техники безопасности в лаборатории

Общие положения. Работать в лаборатории необходимо в халате, защищая одежду и кожу от попадания и разъедания реактивами и обсемененности микроорганизмами.

До выполнения каждой лабораторной работы можно приступить только после получения инструктажа по технике безопасности и разрешения преподавателя.

Приступая к работе, необходимо: осознать методику работы, правила ее безопасного выполнения; проверить соответствие взятых веществ тем веществам, которые указаны в методике работы.

Опыт необходимо проводить в точном соответствии с его описанием в методических указаниях, особенно придерживаться очередности добавления реактивов.

Для выполнения опыта пользоваться только чистой сухой лабораторной посудой. Если в ходе опыта требуется нагревание реакционной смеси, надо следовать предусмотренным методическим указаниям способа нагрева: на водяной бане, на электроплитке.

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

Работа с реактивами. Необходимо внимательно следить за тем, чтобы реактивы не попадали на лицо, руки и одежду.

Разлитые кислоты или щелочи необходимо немедленно засыпать песком, нейтрализовать и только после этого проводить уборку.

При попадании на кожу или одежду кислоты надо смыть ее большим количеством воды, а затем 3-5 % раствором питьевой соды или разбавленным раствором аммиака.

При попадании на кожу или одежду щелочи после смывания ее большим количеством воды нужно провести обработку 2-3 % раствором борной, лимонной или уксусной кислот.

Вещества, фильтры, бумагу, использованные при работе, следует выбрасывать в специальное ведро, концентрированные растворы кислот и щелочей также сливать в специальную посуду.

Избыток реактива нельзя высыпать и выливать обратно в сосуд, из которого он был взят. После расходования реактива банку или стакан необходимо сразу закрыть пробкой и поставить на место.

Сухие реактивы брать с помощью лопаток, пластмассовых или металлических шпателей. Шпатель должен быть всегда сухим и чистым (перед работой его следует тщательно обтереть).

Когда реактив отбирается пипеткой, ни в коем случае нельзя той же пипеткой, не вымыв ее, брать реактив с другой емкости.

При наливании реактивов нельзя наклоняться над сосудом, предотвращая попадания брызг на лицо или одежду.

Нельзя держать банку или стакан с реактивом, которую нужно открыть, в руках, ее надо поставить на лабораторный стол и только после этого открывать. Размешивать реакционную смесь в сосуде стеклянной палочкой или шпателем надо осторожно, не допуская разлома сосуда.

Держать сосуд при этом необходимо за ее горловину.

При закрывании толстостенной посуды пробкой следует держать посуду за верхнюю часть горловины.

Нагретый сосуд нельзя закрывать притертой пробкой, пока он не охладится. В случае пореза стеклом нужно сначала внимательно осмотреть рану и извлечь из нее осколки стекла, если они есть, а затем обмыть раненное место 2 % раствором перманганата калия, смазать йодом и завязать бинтом или заклеить лейкопластырем.

Работа с 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).

При работе с водяной баней нельзя пробовать степень нагрева воды рукой. При неисправности в работе электроприбора (например, подсветке в микроскопе) необходимо обратиться к преподавателю. Чинить самостоятельно приборы запрещается.

При *возникновении пожара* прежде всего надо выключить все нагревательные приборы, затем тушить пламя. Его нельзя задувать. Если горят органические вещества, не следует заливать пламя водой. Используйте песок, пожарные одеяла, огнетушители (лучше углекислотные).

При незначительных ожогах (горячими предметами, веществами или паром) место ожога необходимо обработать спиртом или крепким раствором перманганата калия, а при более тяжелых ожогах следует немедленно обратиться к врачу.

В *опытах с нагревом* необходимо пользоваться посудой, которая имеет соответствующую маркировку.

Особо следует учитывать *правила работы с биообъектами*: работу с биологическим материалом проводить только инструментами; при случайном попадании биологического материала (особенно микроорганизмов) на стол руки нужно провести обработку дезинфекционным раствором (например, хлорамином); после работы необходимо тщательно вымыть руки с использованием дезинфекционных средств (детергентов).

Раздел 1. Продуценты молочнокислого брожения

Лабораторная работа № 1. Продуценты молочнокислого брожения пищевой биотехнологии

Цель работы: знакомство с компонентами биотехнологического процесса (продуцентом, морфологией микроорганизмов молочнокислого брожения, режимом и химизмом молочнокислого брожения).

Задачи:

- ознакомиться с продуцентами молочнокислого брожения, строением клетки;
- изучить гомоферментативное и гетероферментативное брожение и их продуценты;
- изучить продукты молочнокислого брожения, способы их обнаружения.

Теоретическое обоснование. Брожение - анаэробный ферментативный окислительно-восстановительный процесс превращения органических веществ, благодаря которому получают энергию живые организмы для жизнедеятельности. Может осуществляться у животных, растений и микроорганизмов. Некоторые бактерии, микроскопические грибы и простейшие растут, используя только ту энергию, которая высвобождается при брожении. Исходные субстраты в брожении - главным образом углеводы, органические кислоты.

В зависимости от сбраживаемого субстрата и путей его метаболизма в результате брожения могут образовываться спирты (этанол и др.), карбоновые кислоты (молочная, масляная и др.), ацетон и другие органические соединения, CO_2 , а в ряде случаев - H_2 . В соответствии с основными продуктами, образующимися при брожении, различают спиртовое, молочнокислое, маслянокислое ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 = \text{CH}_3\text{--CH}_2\text{--CH}_2\text{--COOH} + 2\text{CO}_2 + 2\text{H}_2$), пропионовокислое ($3\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 = 4\text{CH}_3\text{--CH}_2\text{--COOH} + 2\text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$) и другие виды брожения. Брожение играет важную роль в круговороте веществ в природе, благодаря которому происходит анаэробное расщепление органических веществ, например, целлюлозы. Ряд видов брожения, вызываемых микроорганизмами, имеет практическое значение. Например, спиртовое - для получения этанола в виноделии, пивоварении, хлебопекарной промышленности; молочнокислое - для получения кисломолочных продуктов и молочной кислоты, а также при силосовании кормов; пропионовокислое - в сыроделии).

Продуценты молочнокислого брожения. По характеру брожения молочнокислые бактерии делятся на две группы:

- 1) гомоферментативные, когда продукт разложения - молочная кислота,
- 2) гетероферментативные, вызывающие образование, кроме молочной кислоты, других продуктов брожения: спирта, уксусной кислоты, CO_2 и др.

Представители гомоферментативного брожения.

Молочнокислый стрептококк (Streptococcus lactis). Имеет вид овальных кокков диаметром 0,5-1 мкм, которые располагаются в культуре попарно. Это диплококки, а короткими цепочками - стрептококки. Оптимальная температура развития 30-35 °С. Сбраживает молочный сахар (лактозу), а также мальтозу. Молоко свертывается через 10-12 часов.

Болгарская палочка (Lactobacterium bulgaricum). Неподвижная, располагается в виде отдельных клеток и коротких цепочек. Оптимальная температура ее развития 40-45 °С.

Ацидофильная палочка (Lactobacterium acidophilum) (рис. 2). По морфологии близка к болгарской палочке, но имеет другой температурный оптимум развития: 37 °С. Используется для изготовления ацидофилина.

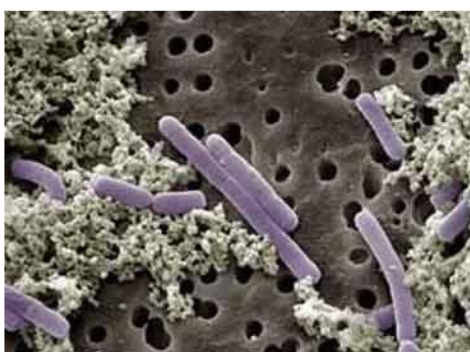


Рисунок 2. Молочнокислые бактерии (*Lactobacterium acidophilum*)

Огуречная палочка (Lactobacterium cucumeris). Неподвижная бактерия, развивается в рассоле засоленных огурцов, капусты, в силосе.

Представители гетероферментативных бактерий.

В промышленности используют культурные расы бактерий, которые имеют ряд преимуществ перед дикими формами.

Капустная палочка (Lactobacterium brassicae). Вместе с огуречной встречается в заквашенных овощах, сцеплена в пары и цепочки. Оптимум развития 25 °С. В молочнокислых продуктах можно встретить и пропионовых бактерий, попадающих в молоко из почвы и с растений. Им принадлежит значительная роль при созревании сычужных сыров.

Кефирные дрожжи (Saccharomyces kefir). Переводят молочный сахар (лактозу) в спирт, небольшое количество которого вырабатывается этими организмами.

Молочная плесень (Geotrichum candidum). Микроскопический гриб из класса несовершенных грибов, аэроб. Образует на плотных питательных средах белые пушистые колонии. Появляется на поверхности кисломолочных продуктов (простокваша, ацидофилин и др.), огуречного рассола. Его можно обнаружить сверху на молочнокислых продуктах. Имеет мицелий (мицелий делится поперечными перегородками на отдельные клетки - оидии), распадающийся на четырехугольные или овальные клетки. Окисляет молочную кислоту до CO₂ и воды, ухудшая качество скисшего молока (рис. 3)

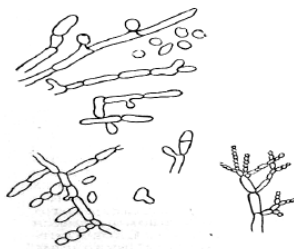
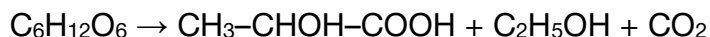


Рисунок 3. Молочная плесень

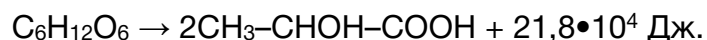
Опыт 1.1. Химизм молочнокислого брожения

Молочнокислое брожение вызывается молочнокислыми бактериями, которые с помощью ферментов сбраживают молочный сахар (лактозу) и любой другой сахар (глюкозу) до молочной кислоты и других продуктов.

При гетероферментативном молочнокислом брожении:



При гомоферментативном молочнокислом брожении:



Процесс идет с накоплением энергии в виде АТФ.

Аденозинтрифосфорная кислота (АТФ) - органическое соединение, содержащее богатые энергией остатки фосфорной кислоты. В организме АТФ образуется в ходе окислительных процессов и в реакциях гликолитического распада углеводов. При распаде АТФ образуются аденозиндифосфорная кислота и остаток фосфорной кислоты, при этом выделяется энергия для процесса метаболизма (жизнедеятельности).

Реактивы: дистиллированная вода, водный раствор метиленового синего, 10 % раствора серной кислоты, 2 % раствор $KMnO_4$; 0,5 % раствор $AgNO_3$; раствор NH_4OH ; 5 % раствора фенола; 5 % раствора хлорного железа ($FeCl_3$); свежее молоко; фенолфталеин; 0,1 н раствор едкого натра.

Оборудование: предметное стекло, микроскоп, фильтр бумажный, коническая колба, термостат.

Ход работы.

Нанести одну каплю какого-либо молочного продукта на тщательно очищенное предметное стекло, разбавить каплей дистиллированной воды и сделать тонкий мазок, чуть подсушить на воздухе. Затем провести окраску мазка в течение 3-5 мин водным раствором метиленового синего, промыть водой, высушить и микроскопировать. Строение бактериальной клетки представлено на рисунке 4.

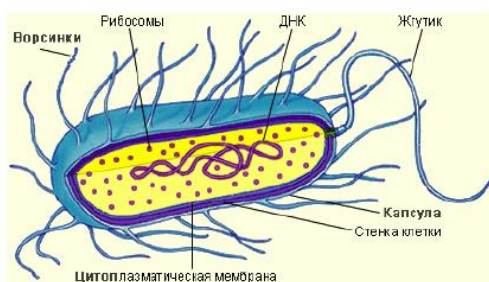


Рисунок 4. Строение бактериальной клетки

Клеточная стенка построена из углеводов, белков, липидов (пептидогликаны или липополисахариды). Плазматическая мембрана построена из белков (гликопротеиды) и липидов (гликолипиды) и связана с полисахаридами (рис. 5). Плазматическая мембрана осуществляет функции, связанные с регулируемым избирательным трансмембранным транспортом веществ, и исполняет роль первичного клеточного анализатора.

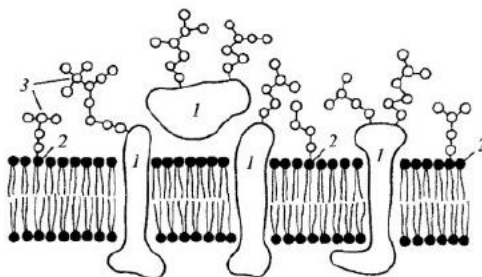


Рисунок 5. Схема строения плазматической мембраны

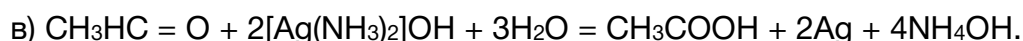
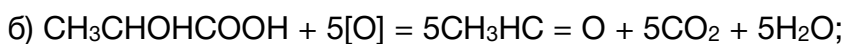
Опыт 1.2. Качественные реакции на молочную кислоту

1. *Определение уксусного альдегида.* Кислое молоко фильтруют через складчатый фильтр, к 10 мл фильтрата добавляют 1 мл 10 % раствора серной кислоты, нагревают в конической колбе до кипения, затем по каплям прибавляют 2 % раствор (2 мл) KMnO_4 .

В этих условиях происходит окисление молочной кислоты с KMnO_4 до CH_3CONH_2 (уксусный альдегид):



Затем покрывают горлышко колбы фильтровальной бумагой, смоченной аммиачным раствором оксида серебра (смачивают бумагу вначале 0,5 % раствором AgNO_3 , затем раствором NH_4OH). Бумага темнеет под влиянием паров уксусного альдегида:



2. *Реакция Уффельмана (проба с фенолом).* В пробирку к 10 мл 5 % раствора фенола добавить несколько капель 5 % раствора хлорного железа (FeCl_3). Наблюдается образование интенсивно окрашенного синего раствора. Прибавление

одной-двух капель сыворотки кислого молока, содержащей молочную кислоту, делает раствор желтоватым (образуется молочнокислое железо).

Опыт 1.3. Определение кислотности молока

В широкодонную колбу объемом 150 мл наливают 40 мл свежего молока, закрывают ватной пробкой и помещают в термостат при температуре 30-35 °С до следующего занятия. В другой порции молока определяют его исходную кислотность. Для этого в коническую колбу на 50 мл наливают 10 мл молока, добавляют 20 мл дистиллированной воды и две-три капли фенолфталеина. Смесь тщательно взбалтывают и титруют 0,1 н раствором едкого натра до слабо-розовой окраски индикатора. Рассчитывают кислотность в градусах Тернера. Градус Тернера (°Т) - условная величина, равная количеству миллилитров 0,1 н раствора щелочи, израсходованного на нейтрализацию 100 мл молока.

Пример расчета:

На титрование 10 мл молока пошло 5 мл 0,1 н раствора щелочи.

Рассчитаем количество щелочи, израсходованное на титрование 100 мл молока:

мл щелочи — 10 мл молока;

X мл щелочи — 100 мл молока.

Кислотность в градусах Тернера составит: $X = 5 \cdot 100/10 = 50$ °Т.

Кислотность парного молока колеблется от 10 до 25 °Т.

Предельная кислотность молока колеблется от 110 до 115 °Т.

Отчет по лабораторной работе оформить в соответствии с приложением 6.

Контрольные вопросы.

1. Как образуется уксусный альдегид в молочнокислых продуктах?
2. Как осуществляется регуляция транспорта веществ в клетку продуцента?
3. Что является питательной средой для молочнокислых бактерий?

Приведите формулы веществ, которые они используют для получения энергии.

4. Что является основным источником энергии для молочнокислых бактерий?

5. Играет ли роль кислород при молочнокислом брожении?

6. Какие моносахариды и дисахариды подвергаются сбраживанию?

Приведите примеры.

7. Напишите схему превращения субстрата молочнокислого брожения до пировиноградной кислоты; затем ввиду того, что ее декарбоксилирование (отщепление CO₂), как при спиртовом брожении, не происходит (так как молочнокислые бактерии лишены соответствующих ферментов) покажите восстановление с участием восстановленной формы НАД в молочную кислоту.

Лабораторная работа № 2. Изучение биотехнологии кисломолочных напитков

Цель работы – практически ознакомиться с технологическим процессом производства кисломолочных напитков, изучить влияние технологических режимов производства на качественные показатели кисломолочных напитков.

Задачи: - изучить основные технологические операции процесса производства кисломолочных напитков.

Теоретическое обоснование. Кисломолочные напитки должны иметь чистые кисломолочные вкус и запах, без посторонних привкусов и запахов, со специфическими особенностями в зависимости от вида вырабатываемого продукта и требований документации: с выраженным привкусом пастеризации – для ряженки и варенца; со слегка острым, дрожжевым привкусом – для кефира; привкусом внесенного наполнителя – для молочных составных продуктов; в меру сладкий – при выработке продукта с сахаром или подсластителем; с соответствующим вкусом и ароматом внесенного компонента – при выработке продукта со вкусоароматическими пищевыми добавками и вкусовыми ароматизаторами.

Консистенция должна быть однородной, с нарушенным или ненарушенным сгустком в зависимости от способа производства (резервуарного или термостатного); для простокваши характерна плотная консистенция без газообразования, для кефира допускается газообразование, вызванное действием микрофлоры кефирных грибков, для продуктов с наполнителями допускается наличие мелких частиц плодов и ягод. Продукты, выработанные с применением стабилизаторов, могут иметь желеобразную или кремообразную консистенцию.

Цвет жидких кисломолочных продуктов: молочно-белый, равномерный по всей массе – для кефира и простокваши; светло-кремовый, равномерный по всей массе – для ряженки; с цветом внесенного наполнителя – при выработке продуктов со вкусоароматическими пищевыми добавками.

По микробиологическим показателям кисломолочные напитки должны соответствовать требованиям ТР ТС 033/2013 (Технический регламент Таможенного союза «О безопасности молока и молочной продукции») (табл. 1).

Таблица 1

Микробиологические показатели кисломолочных напитков

Наименование продукта	Содержание заквасочной микрофлоры, КОЕ/г, см ³	Масса продукта (г, см ³), в которой не допускаются			Дрожжи (Д), плесени (П), КОЕ/г, не более
		БГКП (коли-формы)	Патогенные, в том числе сальмонеллы	<i>S.aureus</i>	
Кисломолочные продукты со сроком годности не более 72 ч:	Молочно-кислых микроорганизмов не менее				
без компонентов	1 · 10 ⁷	0,01	25	1,0	–
с компонентами	То же	0,01	25	1,0	–
Кисломолочные продукты со сроком годности более 72 ч:	Молочно-кислых микроорганизмов не менее				
без компонентов	1 · 10 ⁷	0,1	25	1,0	Д–50*, П–50
с компонентами	То же	0,01	25	1,0	Д–50*, П–50
обогащенные бифидобактериями и другими пробиотическими микроорганизмами	Бифидобактерий и (или) других пробиотических микроорганизмов не менее 1 · 10 ⁶ в сумме	0,1	25	1,0	Д–50*, П–50

*Кроме напитков, изготавливаемых с использованием заквасок, содержащих дрожжи.

**Кроме того, в 25 г (см³) продукта должны отсутствовать листерии *L. monocytogenes*.

В готовом продукте нормируются массовая доля жира, которая может изменяться от 0,1 до 10,0 %, массовая доля белка; титруемая кислотность: от 85 до 130 °Т – для кефира и простокваши; от 70 до 110 °Т – для ряженки, от 75 до 140 °Т – для йогурта. Температура продукта при выпуске с предприятия должна составлять 4±2 °С. Фосфатаза или пероксидаза в продукте должны отсутствовать.

Содержание потенциально опасных веществ (токсичных элементов, микотоксинов, диоксинов, меламина, антибиотиков, пестицидов, радионуклидов в кисломолочных напитках не должно превышать допустимые уровни, установленные ТР ТС 021/2011 (Технический регламент Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции»).

В зависимости от способа организации процесса сквашивания смеси различают резервуарный и термостатный способы производства кисломолочных напитков.

При резервуарном способе заквашивание, сквашивание молока, образование и

формирование молочно-белкового сгустка происходит в одной емкости. Затем сгусток с помощью насосов или самотеком подают на фасовку. При этом сгусток подвергается механическому воздействию, нарушается его структура, он становится более жидким. Однако при резервуарном способе производства, по сравнению с термостатным, в 1,5 раза увеличивается количество продукции, получаемой с 1 м² производственной площади, повышается производительность труда, в большей степени гарантируется однородность качества продукта по единицам упаковки.

При производстве кисломолочных напитков термостатным способом заквашенную смесь перемешивают и расфасовывают в потребительскую тару. Расфасованный продукт подвергают сквашиванию в термостатной камере. Охлаждение (при необходимости и созревании) продукта происходит в холодильной камере. При таком способе сквашивания структура сгустка не нарушается, а сам сгусток имеет более вязкую консистенцию.

В настоящее время в промышленности наибольшее распространение получил резервуарный способ как самый экономичный, однако на производстве часто сталкиваются с такими пороками кисломолочных напитков, как «излишне жидкая консистенция», «отделение сыворотки». Кроме напитков, изготавливаемых с использованием заквасок, содержащих дрожжи.

Кроме того, в 25 г (см³) продукта должны отсутствовать листерии *L. monocytogenes*.

Основными факторами, оказывающими наибольшее влияние на качество и срок годности этих продуктов, являются:

- состав исходного сырья;
- состав нормализованной смеси;
- режимы гомогенизации и тепловой обработки;
- качество закваски, продолжительность сквашивания;
- способ и продолжительность охлаждения сгустка;
- уровень механического воздействия на сгусток, конструкция технологической линии, фасовочного оборудования.

Состав исходного сырья. Выработать высококачественные кисломолочные напитки трудно без подбора молока-сырья, цель которого – максимальное снижение числа таких факторов риска, как низкое содержание белка, пониженная термоустойчивость, наличие ингибиторов роста заквасочных культур, фальсификация молока.

Плотность молока должна быть не менее 1027 кг/м³, при выработке кефира – не менее 1028 кг/м³, титруемая кислотность – не более 19°Т. Массовая доля белка в молоке, направляемом на выработку кисломолочных напитков, должна составлять 3 % и более. Состав белка молока также оказывает влияние на качество молочно-белкового сгустка. Соотношение сывороточный белок/казеин в молоке-сырье варьирует от 0,18 до 0,28.

Термостойкость молока-сырья, направляемого на выработку кисломолочных напитков, не должна быть ниже III группы по алкогольной пробе.

Молоко, направляемое на выработку кисломолочных напитков, не должно содержать ингибирующих веществ.

Основными ингибиторами, не разрушающимися при тепловой обработке молока, являются:

- антибиотики;
- остаточное содержание пестицидов, моющих и дезинфицирующих средств;
- радиоактивные вещества (содержание I131 6-12 кБк/кг вызывает уменьшение количества молочнокислых микроорганизмов);
- кадмий (подавление роста термофильных стрептококков наблюдается при содержании кадмия выше 5 мкг/л);
- жирные кислоты (1000 мг/л оказывают ингибирующее действие);
- бактериофаги (вирусы);
- маститное молоко;
- некоторые виды кормов (заплесневевший силос и т. п.), рацион коров и др.

Качество кисломолочных напитков в большой степени зависит от сезонных изменений молока. Наиболее значительные изменения состава молока происходят в переходный период от зимы к весне и в конце осени. Наблюдается снижение сухих веществ, общего белка и казеина, витаминов и микроэлементов, изменение других составных частей, что сказывается на продолжительности сквашивания молока и качестве готового продукта.

Состав нормализованной смеси. Уровень белка (или содержание сухого обезжиренного молочного остатка – СОМО) в молоке оказывает существенное влияние на консистенцию любого кисломолочного напитка, особенно для нежирного и маложирного продукта, поскольку это практически основной фактор, определяющий качество структуры кисломолочного геля и ее стабильность. Количество добавляемого сухого или сгущенного молока для повышения сухих веществ в нормализованной смеси обуславливается влиянием на вкусовые достоинства продукта, его однородность, а также экономической целесообразностью. Установлено, что во избежание дефектов вкуса нормализацию смеси предпочтительнее проводить до содержания СОМО 11–12 %.

Количество сахара, вносимого в нормализованное молоко, также оказывает влияние на качество сгустка. Его содержание более 6 % тормозит развитие заквасочной микрофлоры, что связано с осмотическим эффектом и снижением активности воды. Отмечается удлинение клеток, меняется их форма. При этом вязкость продукта снижается. Поэтому рекомендуется добавлять до 5 % сахара к молочной основе, а необходимую сладость достигать путем введения в сквашенное молоко фруктово-ягодных наполнителей или подсластителей.

Обычно сахар вносится с остальными ингредиентами при температуре около 40 °С. Он может быть внесен в виде сахарного сиропа 65–67 % концентрации, но при этом молоко нормализуют с учетом дополнительно вносимой воды (35–33 %). Добавление

сиропа в сгусток требует более тщательного и длительного перемешивания или специального оборудования для смешивания и может отрицательно влиять на сгусток.

В производстве такого кисломолочного напитка, как йогурт, сложилась практика применения стабилизирующих добавок с целью предотвращения отделения сыворотки, улучшения однородности сгустка, повышения его вязкости, прочности, когда этого нельзя достичь применением других технологических и технических средств. Использование стабилизирующих добавок оказывает определяющее влияние среди прочих факторов при условии учета всех закономерностей и условий формирования консистенции. По схеме технологического процесса производства йогурта предусматривается внесение стабилизаторов в нормализованную смесь перед гомогенизацией. Это способствует более однородному распределению стабилизирующих веществ в молочной смеси и более гомогенной консистенции готового продукта.

Режимы гомогенизации нормализованной смеси. Гомогенизация оказывает существенное влияние на консистенцию продукта посредством диспергирования жировых шариков и последующего включения их в структуру кисломолочного геля: увеличивается прочность геля, уменьшается синерезис из-за повышения гидрофильности и способности связывать воду благодаря взаимодействию казеина и мембран жировых шариков и взаимодействию белок-белок. При этом термостабильность белков уменьшается вследствие изменений в их взаимодействии из-за сдвига солевого баланса и некоторой денатурации белков. Причем чем больше массовая доля сухих веществ или жира в нормализованной смеси, тем большее влияние гомогенизация оказывает на термостабильность. Поэтому необходимо учитывать кислотность гомогенизируемой смеси и ее состав. При рН ниже 6,6–6,55 (кислотность – более 20 °Т) свойства продукта из гомогенизированного сырья ухудшаются.

Обычно молочную основу для кисломолочных напитков рекомендуется гомогенизировать одноступенчато при температуре 65–70 °С и давлении $15 \pm 2,5$ МПа (при этом достигается средний диаметр жировых шариков от 1,38 до 0,69 мкм).

Жировые шарики молока после гомогенизации ведут себя подобно крупным мицеллам казеина, так как их оболочки состоят в основном из него и участвуют в процессе кислотного свертывания молока. Уменьшение диаметра жировых шариков с 1,8 до 1,1 мкм вызывает повышение стойкости продукта при хранении в два раза.

По некоторым данным, гомогенизация молочной основы после тепловой обработки приводит к достижению более высокой стойкости продукта, так как во время образования новых жировых шариков гомогенизатор благодаря действию поверхностно-активных сил вызывает разрывы казеиновых мицелл, и при сквашивании гидрофобные взаимодействия приводят к образованию более стабильной белковой системы. Но в этом случае возникает опасность повторного загрязнения продукта, и для ее исключения необходим асептический гомогенизатор.

Режимы пастеризации нормализованной смеси. Обычно пастеризацию смеси проводят после гомогенизации. Технологическими инструкциями по производству

диетических кисломолочных напитков (за исключением варенца и ряженки) рекомендованы следующие режимы тепловой обработки нормализованного молока: 85–87 °С с выдержкой 10–15 мин или 90–92 °С с выдержкой 2–8 мин.

В результате процесса пастеризации происходят:

- разрушение всех вегетативных клеток, кроме спор, большей части ферментов, кроме некоторых термоустойчивых бактериальных протеиназ и липаз, бактериоцинов, лактопероксидазной системы;
- взаимодействие α - и β -глобулинов, β -глобулина и α -казеина на поверхности казеиновых мицелл и в мембранах жировых шариков и вследствие этого увеличение гидрофильности мицелл казеина и их размера, а также количества белка, связанного с жиром. Последнее приводит к уменьшению отстоя жира, увеличению прочности и стабильности геля, снижению синерезиса;
- перераспределение кальция, фосфора, магния между водной и коллоидными формами, удаление части растворенного кислорода, азота и углекислого газа, что приводит к снижению рН, окислительно-восстановительного потенциала. За счет образования SH-групп появляются антиоксидантные свойства (максимум наблюдается при 90 °С с выдержкой 10 мин), изменяются органолептические показатели, повышается устойчивость жира к окислению.

Изменение структурно-механических свойств, влагоудерживающей способности кисломолочных напитков под действием тепловой обработки находится в прямой связи со степенью денатурации сывороточных белков молока. Для улучшения консистенции кисломолочных напитков рекомендуется проводить тепловую обработку до достижения степени денатурации 70–99 % сывороточных белков. При этом необходимо учитывать термоустойчивость сырья, так как при рН молока менее 6,6 и температуре выше 90 °С сывороточные белки осаждаются не на мицеллы казеина, а непосредственно в межмицеллярную жидкость.

Качество закваски, продолжительность сквашивания. В настоящее время промышленность вырабатывает широкий ассортимент диетических кисломолочных продуктов, которые можно классифицировать по видам применяемых заквасок. Различные комбинации молочнокислых стрептококков и палочек, бифидобактерий, дрожжей создают микробиологическую основу технологии всего разнообразия диетических кисломолочных продуктов.

Основным биохимическим процессом, протекающим при приготовлении кисломолочных продуктов типа простокваши, йогурта, является молочнокислое брожение, а в кисломолочных продуктах типа кефира и кумыса – смешанное молочнокислое и спиртовое брожение.

При молочнокислом брожении на молочный сахар воздействует фермент лактаза (β -галактозидаза), выделяемый молочнокислыми бактериями. На первой стадии брожения молекула лактозы расщепляется на две молекулы моносахаридов – глюкозу и галактозу. Дальнейшим изменениям подвергается глюкоза, галактоза же переходит в

нее и таким образом подвергается брожению.

В результате ферментативных превращений из глюкозы вначале образуется пировиноградная кислота, которая под воздействием фермента кодегидразы затем восстанавливается до молочной кислоты.

В результате побочных процессов, протекающих одновременно с молочнокислым брожением, из лактозы образуются некоторые летучие кислоты, углекислый газ и др. Под действием ароматообразующих бактерий молочный сахар разлагается, образуя диацетил, придающий продукту специфический запах.

При смешанном брожении на лактозу воздействуют ферменты молочнокислых бактерий и молочных дрожжей. Молочный сахар вначале также расщепляется на глюкозу и галактозу, из которых образуется пировиноградная кислота. Под действием ферментов молочнокислых бактерий часть пировиноградной кислоты восстанавливается до молочной кислоты, а другая под действием фермента карбоксилазы, содержащегося в клетках молочных дрожжей, расщепляется на уксусный альдегид и углекислый газ. Уксусный альдегид, в свою очередь, восстанавливается в этиловый спирт.

Под действием образующейся в процессе молочнокислого и смешанного брожения молочной кислоты и падении pH до 5,7–5,8 наблюдается постепенная нейтрализация отрицательно заряженных групп казеина (карбоксильных и гидроксид-ионов фосфорной кислоты), а также удаление из состава казеиновых мицелл коллоидного фосфата кальция. Этот процесс сопровождается дезинтеграцией частиц и распадом на субмицеллы.

При pH 4,6–4,7 казеин переходит в изоэлектрическое состояние, характеризующееся равенством положительных и отрицательных зарядов. Наступает полное разрушение мицеллярной структуры казеина, снижение степени его гидратации и агрегирование гидрофобных частиц. Далее процесс агрегирования частиц преобладает и наступает процесс структурообразования с формированием единой пространственной сетки молочного сгустка (геля), в петли которого захватывается дисперсионная среда с шариками жира и другими составными частями молока.

Качество кисломолочных напитков зависит от направления развития процесса сквашивания, которое определяется микрофлорой, внесенной с закваской, оставшейся в пастеризованном молоке и попавшей в него с оборудования. При сквашивании часть микрофлоры незаквасочного происхождения активизируется, часть подавляется в присутствии микроорганизмов закваски, некоторые, например, бактериофаги, подавляют развитие самой закваски. Интенсивность этих процессов и конечное соотношение между различными представителями зависят от качества молока, температуры и длительности сквашивания, а также эффективности охлаждения.

Одним из основных путей уменьшения количества посторонних микроорганизмов является сокращение продолжительности процесса сквашивания.

Снижение температуры сквашивания кисломолочных напитков ниже

рекомендуемой технологическими инструкциями замедляет скорость кислотообразования, что приводит к образованию слабого сгустка, склонного к синерезису и развитию посторонней микрофлоры. Низкая кислотность продукта может вызвать рост количества бактерий кишечной палочки и психротрофных бактерий в процессе хранения. Увеличение продолжительности сквашивания термофильными стрептококками свыше 6 ч способствует развитию термоустойчивых молочнокислых палочек. При сквашивании необходимо точное поддержание температуры молока, так как ее колебания, а также перемешивание при pH ниже 5,9 могут привести к образованию неоднородного сгустка.

При производстве йогурта внесение большого количества производственной закваски на термофильном стрептококке и болгарской палочке и применение температуры сквашивания выше 40 °C способствуют активизации болгарской палочки. Излишнее ее развитие вызывает ухудшение органолептических показателей продукта, приводит к выраженному кислому вкусу и иногда даже к появлению горечи.

Одной из основных причин замедления процесса сквашивания молока (а порой и его несквашивания), развития посторонней флоры является присутствие в молоке бактериофага. Для предотвращения попадания в молоко бактериофага необходимо ежедневно менять штаммы, использовать закваски прямого внесения для получения продукта или производственной закваски, асептические методы для получения заквасок, применять надлежащую термообработку молока, эффективную стерилизацию оборудования и инвентаря, обеспечить очистку воздуха в заквасочной и производственной зонах.

Для улучшения микробиологических показателей готового продукта и повышения сроков его годности процесс сквашивания проводят в асептических резервуарах с избыточным давлением стерильного воздуха (0,005–0,01 МПа). Последующее смешивание с наполнителем, охлаждение и розлив в этом случае также осуществляются в асептических условиях.

Способ и продолжительность охлаждения сгустка. На органолептические, физико-химические и микробиологические показатели кисломолочных напитков оказывают также влияние своевременность прекращения процесса сквашивания, начало перемешивания и условия охлаждения. Правильная оценка свойств сгустка и точное определение момента его готовности к перемешиванию представляют особую важность. Момент готовности сгустка обычно устанавливают визуально по его достаточной прочности и вязкости, а также по кислотности.

Своевременное охлаждение позволяет избежать его перекипания и связанного с ним ухудшения органолептических, реологических и синергических свойств.

Кислотность молочно-белкового сгустка в момент прекращения процесса сквашивания и начала перемешивания оказывает существенное влияние на структурно-механические свойства готового продукта также и в случае выработки его со стабилизаторами. Чем выше кислотность сгустка, тем выше вязкость готового продукта. В то же время для разных видов стабилизаторов степень зависимости

вязкости готового продукта от кислотности сгустка различна.

Так как структурно-механические свойства конечной структуры зависят от степени ее предшествующего разрушения, механическое воздействие на сгусток при перемешивании, перекачивании, розливе должно быть минимальным.

Молочно-белковый сгусток способен набухать и уплотняться, если остается ненарушенным при охлаждении, поэтому для сохранения густой, вязкой консистенции продукта охлаждение проводят в два этапа. Первый (частичное охлаждение до 20 – 25 °С) осуществляется с целью замедления роста кислотности сгустка в резервуаре при щадящем режиме перемешивания.

В настоящее время производят кисломолочные продукты с фруктовыми наполнителями. Установлено, что в качестве фруктовых наполнителей для кисломолочных продуктов можно использовать:

- пастеризованные и стерилизованные фрукты с сахаром;
- плоды и ягоды натуральные, в замороженном виде, а также засахаренные;
- цукаты;
- желеобразную массу с кусочками плодов;
- фруктовые сиропы и др.

Содержание сахара в наполнителях должно составлять вместе с фруктозой до 64 %. Это необходимо для получения готового продукта с однородной (без крупинки белка) консистенцией. При использовании фруктовых наполнителей с пониженным содержанием сахара и повышенной кислотностью (рН ниже 3,2) возможно дополнительное свертывание белка в сквашенном продукте за счет подкисления.

Желательно, чтобы кислотность фруктового наполнителя была равна кислотности продукта или немного превышала ее, так как в противном случае могут наблюдаться уменьшение стабильности и выделение сыворотки. Нужно учитывать, что некоторые фруктовые наполнители содержат танины (например, сок грейпфрута), которые реагируют с молочными белками и образуют осадок.

С целью получения готового продукта с плотной консистенцией и равномерным распределением фруктового наполнителя по всему объему молочного продукта рекомендуется использовать стабилизаторы консистенции или белковые обогатители (желатин, модифицированный крахмал, пектин, сухое обезжиренное молоко и др.), вводя их в смесь на стадии ее нормализации. В этом случае фруктовый наполнитель не осаждается на дно резервуара или потребительской тары.

При производстве кисломолочных продуктов с фруктовыми наполнителями важным является выбор способа внесения наполнителя в продукт. Наиболее приемлемый способ – их добавление в сквашенный продукт перед расфасовкой. При внесении наполнителей перед сквашиванием может быть нарушен микробиологический процесс сквашивания молока. Кроме того, в процессе сквашивания может резко измениться цвет наполнителя или исчезнуть вовсе. Фруктовые наполнители вносят в резервуар с частично охлажденным молочно-

белковым сгустком, в потоке с использованием смесительного устройства или с помощью дозатора в расфасовочной машине непосредственно в упаковку с продуктом.

Фруктовые наполнители, вносимые в резервуар, не должны быть слишком вязкими, поскольку это затрудняет их смешивание со сгустком, а излишне длительное перемешивание ведет к отделению сыворотки и уменьшению вязкости продукта.

Для смешивания фруктовых наполнителей и молочно-белкового сгустка используют смесительные устройства, состоящие из дозаторов для наполнителя и сгустка и смесительной камеры. Смесители встраивают в трубопровод технологической линии. Они имеют различную конструкцию, например, трубу с приваренными внутри винтовыми лопастями или с вращающимся центральным винтовым поплавком. Фруктовые наполнители дозируются из резервуара в поток сквашенного продукта.

Равномерное распределение наполнителя в сгустке обеспечивается движением лопатками смесителя. При небольших объемах производства могут быть использованы передвижные дозаторы со стационарным смесителем. При больших объемах сгусток и фруктовый наполнитель подаются через общую трубу в смесительную камеру с мешалкой, далее гомогенная смесь поступает в фасовочный автомат. Такие устройства могут быть асептическими.

После внесения наполнителя продукт доохлаждают. Заключительный этап охлаждения продукта с густой консистенцией желательно проводить в холодильной камере. Во время медленного охлаждения (до 4 ± 2 °C) формируется конечная структура и значительно возрастает вязкость продукта.

Продукт «питьевого» типа можно охлаждать в потоке с использованием пластинчатых и трубчатых теплообменников. Пластинчатый теплообменник в этом случае должен иметь большой зазор между пластинами (до 6 мм). Наименьшие потери вязкости продукта наблюдаются в трубчатом охладителе.

При перекачивании разрушение сгустка должно быть минимальным, т. е. необходимо избегать длинных узких трубопроводов с большим количеством задвижек, что может приводить к значительным перепадам давления и кавитации. Следует использовать специальные насосы объемного типа с предохранительными клапанами, расположенные как можно ближе к резервуару.

Для кисломолочного напитка с кусочками фруктов используют объемные роторные насосы кулачкового, лопастного или винтового типа с гибким колесом или пневматические диафрагменные (мембранные) насосы, что позволяет сохранить целостность кусочков фруктов.

Розлив, холодильное хранение продукта. Для увеличения сроков годности продукты фасуют в герметичную упаковку в модифицированной среде (в присутствии CO₂, N₂), в асептических условиях в стерильной зоне в стерильную тару.

Вязкость готового продукта зависит от температуры розлива. Максимальные ее

потери в готовом продукте происходят в случае розлива при 10–20 °С, минимальные – при температуре, находящейся в интервале от температуры сквашивания до 25 °С.

При соблюдении рассмотренных условий производства кисломолочных напитков при холодильном хранении наблюдается улучшение их структурно-механических свойств.

Задание 1. Приготовить простоквашу обыкновенную, ацидофилин и ацидолакт. Выявить влияние температуры пастеризации молока на вкус и консистенцию этих продуктов.

Простоквашу обыкновенную вырабатывают путем сквашивания пастеризованного молока закваской, приготовленной на чистых культурах мезофильных лактококков (*Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis*). Процесс сквашивания проводят при температуре 32±2 °С в течение 6–8 ч до кислотности 75 °Т. Готовый продукт должен иметь плотный, колющийся сгусток, без отделения сыворотки, достаточно выраженные кисломолочные вкус и аромат.

Ацидолакт готовят путем сквашивания пастеризованного молока закваской, приготовленной на чистых культурах вязких и невязких штаммов ацидофильной палочки. Молоко сквашивают при температуре 42±2 °С до кислотности 80 °Т в течение 4–6 ч. Готовый продукт должен иметь чистый кисломолочный вкус и однородную консистенцию, обладать свойственной для данного продукта вязкостью и тягучестью.

Ацидофилин готовят на пастеризованном молоке, сквашивая его закваской, состоящей из ацидофильной палочки, мезофильных лактококков, а также кефирной закваски в равных долях. Сквашивание молока проводят при температуре 33±2 °С в течение 6–8 ч до кислотности 75–80 °Т.

Готовый продукт должен иметь кисломолочный, освежающий, слегка острый вкус, легкий дрожжевой аромат. Консистенцию – однородную, напоминающую жидкую сметану. Допускается газообразование в виде отдельных глазков, вызванное нормальной микрофлорой.

Порядок выполнения работы.

Массовую долю жира в продуктах задает преподаватель.

Опыт 2.1. Определение массовой доли жира в молоке

Следует определить массовую долю жира в исходном молоке. Рассчитать массовую долю жира в нормализованном молоке с учетом нормы внесения и жирности бактериальной закваски по формуле:

$$Ж_{н.м} = (100 Ж_{пр} - K_3 Ж_3) / (100 - K_3),$$

где K_3 – количество закваски, %; $Ж_{н.м}$, $Ж_{пр}$, $Ж_3$ – массовая доля жира в нормализованном молоке, продукте, закваске, соответственно, %.

Ход работы.

Закваску, приготовленную на стерилизованном молоке, вносят в количестве 1–3

%, а на пастеризованном – 3–5 %. Если есть необходимость в нормализации, то рассчитать требуемое количество обезжиренного молока или сливок и провести нормализацию.

Нормализованное молоко следует разделить на две части и провести пастеризацию одной из них при температуре 74 °С с выдержкой 15–20 с, а другой – при 92 °С с выдержкой 2–8 мин.

Взять по две чистые бутылки для приготовления каждого вида продукта, пронумеровать их и внести соответствующие бактериальные закваски. После пастеризации молоко каждой партии первоначально охлаждают до температуры 42 ± 2 °С и наливают его в бутылки, предназначенные для приготовления ацидолакта, затем оставшееся молоко доохлаждают до 33 ± 2 °С и наливают его в бутылки, предназначенные для приготовления простокваши и ацидофилина.

Бутылки с заквашенным молоком следует поместить в соответствующие каждому продукту термостаты. После сквашивания молока и охлаждения продуктов до 6 °С оценить их качество. Следует сравнить органолептические показатели продуктов, определить их титруемую кислотность, изучить влагоудерживающую способность сгустков, приготовить и просмотреть микроскопические препараты продуктов.

Задание 2. Изучить влияние температуры сквашивания молока при производстве кефира на его органолептическую оценку и наличие углекислого газа.

Отличительная особенность кефира состоит в том, что при его производстве используют естественную, сложную по микробиологическому составу, симбиотическую закваску, приготовленную на кефирных грибах. Микроорганизмы, входящие в состав кефирной закваски, участвуют в формировании качества продукта и возникновении пороков (табл. 2).

Таблица 2

Влияние микроорганизмов на качество кефира

Микроорганизмы	Источник попадания	Условия, способствующие размножению	Роль в формировании качества	Порок
Мезофильные лактококки (<i>Lac. lactis</i> , <i>Lac. cremoris</i>)	Закваска	Присутствие дрожжей и уксуснокислых бактерий, неокислая реакция среды	Ведут активный процесс сквашивания, формирования сгустка	–
Ароматообразующие микроорганизмы (<i>Leuc. dextranicum</i>)	Закваска	Температура сквашивания 21–25 °С, летнее молоко, присутствие дрожжей	Накопление аромата, газообразование	При излишнем развитии вспучивание
Мезофильные молочнокислые палочки	Закваска	Длительная выдержка (более двух суток)	Незначительное влияние	–
Термофильные молочнокислые палочки	Закваска, оборудование	Повышенные температуры, увеличение продолжительности процесса сквашивания	Участвуют в накоплении кислоты	Вызывают излишнюю кислотность
Дрожжи	Закваска	Длительная выдержка при повышенных температурах сквашивания и созревания	Образование углекислого газа, специфического вкуса, консистенции	При излишнем развитии вспучивание
Уксуснокислые бактерии	Закваска	То же	Образование специфического вкуса, улучшение консистенции	Излишняя тягучесть, резкий специфический вкус
Бактерии группы кишечной палочки	Оборудование	Температура выше 25 °С	–	Ухудшение микробиологических показателей
Плесневые грибы (<i>Geotrichum candidum</i>)	Оборудование, воздух, закваска	Длительное хранение	–	Плесневение поверхности

Кефир относится к кисломолочным продуктам со смешанным брожением, где наряду с молочной кислотой образуются этиловый спирт и углекислый газ. Возбудителем спиртового брожения являются дрожжи. Способность дрожжей вырабатывать спирт и углекислый газ зависит от многих факторов, из которых наибольшее значение имеют: вид дрожжей, pH среды, температура сквашивания и количество молочного сахара в исходном сырье.

Температура молока при его сквашивании должна быть равна 20–25 °С. Повышение температуры сквашивания молока ускоряет развитие лактококков, в результате чего отстает развитие других микроорганизмов, прежде всего ароматообразующих (меньше накапливается летучих кислот). Поэтому вкус кефира в этом случае невыраженный, напоминающий вкус простокваши. Длительность сквашивания молока при производстве кефира составляет 8–12 ч до образования сгустка кислотностью 80–100 °Т.

В отличие от производства простокваши при выработке кефира недостаточно только сквасить молоко и охладить продукт.

Для приобретения специфических вкусовых качеств необходимо также осуществить процесс созревания (при постепенном охлаждении), в течение которого и происходит накопление углекислоты, летучих кислот и следов спирта. Созревание осуществляют при температуре 14±2 °С. Продолжительность процесса

с момента заквашивания молока должна быть не менее 24 ч.

Кефир является напитком, который должен иметь освежающий, слегка острый вкус, однородную консистенцию. Допускается газообразование в виде отдельных глазков, вызванных нормальной микрофлорой. Кислотность продукта от 85 до 130 °Т.

Опыт 2.2. Влияние температуры сквашивания молока при производстве кефира на его органолептическую оценку и наличие углекислого газа

Исходное молоко следует нормализовать с учетом массовой доли жира в продукте (задает преподаватель) и дозы вносимой закваски (5 %), приготовленной на обезжиренном молоке.

Нормализованное молоко подвергнуть пастеризации при температуре 92 °С с выдержкой 2–8 мин. В бутылки отмерить рассчитанное количество кефирной грибковой закваски и залить молоком, охлажденным в одном случае до 30 °С, в другом до – 22 °С. Молоко хорошо перемешать с закваской, бутылки закрыть колпачками из фольги, пронумеровать образцы и поставить в соответствующие термостаты. После сквашивания молока и выдержки продукта в холодильнике для созревания провести органолептическую оценку образцов кефира при одинаковой температуре.

Измерить вязкость продуктов, оценить образование углекислого газа в исследуемых образцах, приготовить и просмотреть микроскопические препараты кефира.

Оборудование, приборы и материалы. Для приготовления продуктов применяют следующее сырье: молоко коровье, соответствующее ГОСТ 31449; молоко обезжиренное по ГОСТ 31658;

- реактивы и аппаратура для определения титруемой кислотности и массовой доли жира в молоке;
- вискозиметр ВЗ-246;
- микроскоп, материалы и реактивы для приготовления микроскопических препаратов по ГОСТ 53430;
- центрифужные пробирки;
- пробирки диаметром 15–20 мм, стеклянные бутылки, термометры, термостаты.

Методы исследований. Определение физико-химических показателей проводят стандартными и общепринятыми методами:

- температуры – по ГОСТ 26754;
- кислотности – по ГОСТ 3624. В колбу вместимостью от 100 до 250 см³ отмеривают 20 см³ дистиллированной воды и 10 см³ исследуемого продукта, переносят остатки продукта из пипетки в колбу путем промывания пипетки полученной смесью 3–4 раза, добавляют 3 капли фенолфталеина. Смесью тщательно перемешивают и титруют 0,1 н. раствором гидроксида натрия до появления слабо-розового окрашивания, не исчезающего в течение 1 мин;

– *массовой доли жира* – по ГОСТ 5867. Последовательность операций при заполнении жироскопа: отвешивают 11 г продукта в жироскоп с отсчетом до 0,005 г, серную кислоту и изоамиловый спирт.

– *условной вязкости* – с помощью вискозиметра ВЗ-246 (рис. 6) по продолжительности истечения 100 мл исследуемого продукта через сопло с диаметром 4 или 6 мм при температуре 20 °С;



Рисунок 6. Вискозиметр ВЗ-246

– *влагоудерживающих свойств* – 10 мл исследуемого продукта помещают в мерную пробирку и центрифугируют в течение 30 мин, определяя через каждые 5 мин объем сыворотки (в %); строят график, характеризующий интенсивность ее выделения;

– *образование углекислого газа* – в пробирку диаметром 15 мм наливают 20 мл продукта, отмечают уровень и помещают в водяную баню с холодной водой; температуру воды доводят до 90 °С и, вынув пробирку, отмечают уровень сгустка (если продукт содержит углекислый газ, то сгусток становится губчатым и поднимается над сывороткой на высоту от 6 мм до 20–30 мм и более);

– *приготовление и просмотр микроскопических препаратов* – продукт наносят на чистое предметное стекло предварительно прокаленной петлей и распределяют на площади 1–2 см², стараясь сделать мазок возможно более тонким. Препарат высушивают при комнатной температуре или слабым нагреванием над пламенем горелки и фиксируют высушенный препарат, медленно проводя его несколько раз через пламя горелки. Затем окрашивают препарат раствором метиленового голубого. Для этого фиксированный мазок заливают краской, выдерживают в ней 0,5–1,0 мин, смывают водой, фильтровальной бумагой удаляют с препарата основную часть воды и окончательно высушивают его над пламенем горелки. Препарат рассматривают под микроскопом с иммерсионной системой.

Заполнить таблицу 3. Сделать выводы о влиянии температуры пастеризации молока на показатели качества диетических кисломолочных продуктов.

Таблица 3

Характеристика кисломолочных продуктов

Температура пастеризации молока, °С	Вид продукта	Титруемая кислотность, °Т	Органолептическая оценка		Условная вязкость, с
			Вкус и аромат	Консистенция	
74	Простокваша				
	Ацидолакт				
	Ацидофилин				
92	Простокваша				
	Ацидолакт				
	Ацидофилин				

Контрольные вопросы:

1. Дать характеристику технологического процесса производства кисломолочных продуктов.
2. Дать характеристику технологического процесса производства диетических кисломолочных продуктов.
3. Как привести расчет нормализации молока.
4. Что характеризует влагоудерживающие свойства сгустков.
5. Как влияет температура на пастеризацию молока.

Лабораторная работа № 3. Изучение биотехнологии производства творога

Цель работы: закрепить теоретические знания технологического процесса производства творога.

Задачи:

- изучить основные технологические операции процесса производства творога;
- изучить влияние различных факторов на интенсивность отделения сыворотки творожным сгустком, приобрести практические навыки оценки физико-химических показателей качества продукта;
- изучить влияние технологических факторов (сычужного фермента, хлористого кальция и вязкостных свойств бактериальной закваски) на интенсивность отделения сыворотки из сгустка при производстве творога;
- оценить органолептические и физико-химические показатели творога – титруемую кислотность, массовые доли жира и влаги.

Теоретическое обоснование. Согласно ТР ТС 033/2013, творог – кисломолочный продукт, изготавливаемый с использованием смеси заквасочных микроорганизмов лактококков или смеси лактококков и термофильных молочнокислых стрептококков при помощи методов кислотной или кислотно-сычужной коагуляции белков с последующим удалением сыворотки самопрессованием и/или прессованием, и/или центрифугированием, и/или ультрафильтрацией с добавлением или без добавления составных частей молока (до или после сквашивания) в целях нормализации молочных

продуктов.

Продукт вырабатывают из цельного молока, нормализованного молока, обезжиренного молока, восстановленного молока или из их смесей.

Содержание потенциально опасных веществ (токсичных элементов, микотоксинов, диоксинов, меламина, антибиотиков, пестицидов, радионуклидов) в продукте не должно превышать допустимые уровни.

По способу получения продукта со стандартной массовой долей жира различают два способа производства творога: отдельный (из обезжиренного молока с последующим смешиванием молочного сгустка с высокожирными сливками м.д.ж. 50–55 %), а также из нормализованного молока. Нормализация проводится с учетом фактической массовой доли белка в перерабатываемом сырье и коэффициента нормализации.

Коэффициент нормализации устанавливают применительно к конкретным условиям производства, для чего ежеквартально проводят контрольные выработки творога.

По органолептическим, микробиологическим и физико-химическим показателям творог должен соответствовать требованиям, указанным в таблице 4 и приложении 6.

Таблица 4

Органолептические показатели творога (ГОСТ 31453)

Наименование показателя	Характеристика
Консистенция и внешний вид	Мягкая, мажущаяся или рассыпчатая, без ощутимых частиц молочного белка. Для обезжиренного продукта – незначительное выделение сыворотки
Вкус и запах	Чистые, кисломолочные без посторонних привкусов и запахов. Для продукта из восстановленного молока с привкусом сухого молока
Цвет	Белый или с кремовым оттенком, равномерный по всей массе

Методика определения уточненных коэффициентов пересчета белка на массовую долю жира в смеси состоит в следующем. Проводят три-четыре контрольные выработки творога, в которых массовую долю жира в смеси определяют по фактической массовой доле белка и по коэффициентам пересчета.

Далее по данным анализов контрольных выработок рассчитывают поправочный коэффициент массовой доли жира в смеси:

$$K_{ж} = \frac{Ж_{ст} (100 - В_{ф})}{[Ж_{ф} (100 - В_{ст})]},$$

где $K_{ж}$ – поправочный коэффициент жирности смеси; $Ж_{ст}$ – стандартная массовая доля жира в продукте (для творога с м.д.ж. 18,0 % $Ж_{ст} = 18,5$ %; для творога с м.д.ж. 9,0 % $Ж_{ст} = 9,5$ %; $В_{ф}$ – фактическая массовая доля влаги в твороге, полученном в контрольных выработках, %; $Ж_{ф}$ – фактическая массовая доля жира в твороге,

полученном в контрольных выработках, %; $B_{ст}$ – стандартная массовая доля влаги в продукте (для творога с м.д.ж. 18,0 % $B_{ст} = 65$ %; для творога с м.д.ж. 9,0 % $B_{ст} = 73$ %).

Рассчитав $K_{ж}$, определяют уточненный коэффициент пересчета белка на жирность смеси:

$$K_{п} = K_{ж} \cdot \frac{Ж_{см}}{B_{м}}$$

где $K_{п}$ – уточненный коэффициент пересчета белка на жирность смеси; $Ж_{см}$ – массовая доля жира смеси, используемой в контрольной выработке, %; $B_{м}$ – массовая доля белка в молоке, %.

По результатам выработок определяют средний коэффициент пересчета белка на массовую долю жира в смеси по формуле:

$$K_{ср} = (K_{п1} + K_{п2} + K_{п3})/3$$

Для выработки творога, соответствующего требованиям стандарта, массовую долю жира в смеси определяют по среднему значению коэффициента пересчета и массовой доли белка в молоке, поступающем на переработку:

$$V = M_{ф} \cdot 100, \%$$

Для ориентировочных расчетов (в учебном курсовом и дипломном проектировании) можно пользоваться следующими формулами:

$$Ж_{н.см} = B_{м} + K \text{ – для творога с м.д.ж. } 18,0\%;$$

$$Ж_{н.см} = B_{м} \cdot K \text{ – для творога с м.д.ж. } 5 \text{ и } 9\%,$$

где K – коэффициент нормализации, зависящий от вида творога, и способа и условий его производства (табл. 5).

Таблица 5

Значение коэффициента нормализации при производстве творога на различном оборудовании

Способ производства творога (оборудование)	Массовая доля жира в твороге, %					
	5,0		9,0		18,0	
	Весна-лето	Осень-зима	Весна-лето	Осень-зима	Весна-лето	Осень-зима
ВК-2,5	0,20–0,28		0,40–0,50	0,50–0,55	0,15–0,30	0,30–0,40
ТИ-4000	0,15–0,25	0,25–0,35	0,40–0,47	0,47–0,55	0,20–0,28	
Я9-ОПТ	0,28		0,50	0,53	–	–
Линии с ваннами-сетками	0,25–0,29	0,30–0,32	0,50	0,52	–	–

Нормализованное очищенное или обезжиренное (в случае производства обезжиренного творога) молоко пастеризуют.

При производстве творога принято пастеризовать молоко при температуре 78 ± 2

°C с выдержкой 20–30 с. При температуре пастеризации молока выше 80 °C увеличивается степень гидратации казеина, что приводит к получению сгустка, плохо отделяющего сыворотку.

Обезвоживание такого сгустка затрудняется, вследствие чего затягивается производственный процесс, и могут наблюдаться случаи получения творога высокой кислотности с повышенным содержанием влаги. Кроме того, повышение температуры пастеризации приводит к получению сгустка, прочного по структурно-механическим свойствам. При разрезке он сильно дробится, и образуется большое количество белковой пыли, затрудняющей процесс прессования.

Понижение температуры пастеризации до 71–75 °C улучшает способность сгустка к отделению сыворотки, но при этом не используются растворимые белки (альбумин, глобулин), которые не денатурируют при низких температурах и удаляются вместе с сывороткой, вследствие чего уменьшается выход творога.

Кроме того, при низких температурах пастеризации в большей степени сохраняется остаточная микрофлора – молочнокислые стрептококки, являющиеся причиной переокисления творога, а также фермент липаза, способствующий прогорканию жира в процессе хранения продукта.

После пастеризации молоко охлаждают до температуры сквашивания и вносят бактериальную закваску или бактериальный концентрат. Для изготовления творога применяют закваски и бактериальные концентраты:

Л_т (КЛ) – *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis* с добавлением или без добавления *Lactococcus lactis subsp. cremoris*;

Л_д – *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis* с добавлением или без добавления *Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum*;

КД – *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis*;

ЛТ_т (КЛТ) – *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus* с добавлением или без добавления *Lactococcus lactis subsp. cremoris*.

Для производства творога специально подбирают бактериальные закваски, которые способны образовывать сгусток, хорошо отделяющий сыворотку. Не допускается использование чистых культур лактококков, образующих вязкий или слизистый сгусток, так как это приводит к замедлению синерезиса. При этом настолько ухудшается отделение сыворотки, что становится невозможным получение творога, стандартного по влажности.

Температура сквашивания составляет: при использовании Л_т, Л_д, КД – (28±2) °C; КЛ – (30±2) °C; ЛТ_т, КЛТ – (32±2) °C.

По методу образования сгустка различают два способа производства творога: кислотный и кислотно-сычужный. Первый основывается только на кислотной коагуляции белков путем сквашивания молока молочнокислыми бактериями с

последующим нагреванием сгустка для удаления излишней сыворотки. Пространственная структура сгустков кислотной коагуляции белков менее прочная, формируется слабыми связями между мелкими частицами казеина и хуже выделяет сыворотку. Поэтому для интенсификации отделения сыворотки требуется подогрев сгустка. Таким способом изготавливают творог обезжиренный и пониженной жирности, так как при нагревании сгустка происходят значительные потери жира с сывороткой. Кроме того, кислотный способ обеспечивает выработку обезжиренного творога более нежной консистенции.

При кислотно-сычужном способе производства творога после внесения бактериальной закваски добавляют хлористый кальций из расчета 400 г безводной соли на 1000 кг заквашиваемой смеси. Хлористый кальций вносят в виде водного раствора с концентрацией соли от 30 до 40 %. Пастеризованное молоко, вследствие уменьшения в нем количества ионов кальция, хуже свертывается сычужным ферментом, чем сырое. Добавление хлористого кальция восстанавливает его свертываемость.

После введения хлористого кальция в смесь вносят сычужный порошок, или пепсин пищевой, или ферментный препарат ВНИИМС в виде раствора с массовой долей фермента не более 1 %. Доза фермента активностью 100000 ед. на 1000 кг заквашиваемой смеси равна 1 г.

Сычужный порошок или ферментный препарат ВНИИМС растворяют в питьевой воде, предварительно подогретой до температуры 36 ± 3 °С, пепсин растворяют в свежей профильтрованной сыворотке, подогретой до такой же температуры. Объем воды или сыворотки определяют по формуле:

$$V = M_{\text{ф}} \cdot 100,$$

где V – объем воды или сыворотки, см^3 ; $M_{\text{ф}}$ – масса фермента, г; 100 – объем воды или сыворотки для растворения 1 г фермента, см^3 .

В зависимости от активности фермента делают расчет массы фермента по формуле:

$$M_{\text{ф}} = 100000 M_{\text{а.ф}} M_{\text{з.см}} / (A_{\text{ф}} \cdot 1000),$$

где $M_{\text{ф}}$ – масса фермента, г; $M_{\text{а.ф}}$ – масса фермента нормальной активности на 1000 кг молока, г; $M_{\text{з.см}}$ – масса заквашиваемой смеси, кг; $A_{\text{ф}}$ – активность применяемого фермента, ед.; 1000 – масса заквашиваемой смеси, кг.

При сычужной коагуляции под действием сычужного фермента в молекуле казеина происходит гидролиз фосфоамидной связи без отщепления фосфорной кислоты. При этом сычужная коагуляция белков молока протекает в две стадии: на первой стадии – ферментативной – казеин под действием сычужного фермента переходит в параказеин; на второй – коагуляционной – из параказеина образуется сгусток.

При кислотно-сычужном способе производства творога частичное превращение

казеина в параказеин под влиянием сычужного фермента, по существу, предшествует кислотной коагуляции.

Поскольку при переходе казеина в параказеин изоэлектрическая точка смещается с рН 4,6 до 5,2, образование сгустка происходит при более низкой титруемой кислотности, чем при чисто кислотном осаждении, что, в конечном счете, приводит к меньшей кислотности получаемого творога. Кроме того, в образовании структуры сгустка при кислотно-сычужном способе осаждения участвуют кальциевые мостики, образующиеся между частицами параказеина. Наличие этих мостиков упрочняет структуру сгустка, приводит к образованию более плотного сгустка, что в свою очередь предупреждает его распыление при механическом дроблении, благоприятно отражаясь на повышении выхода творога. Такие сгустки лучше отделяют сыворотку, чем кислотные, так как в них быстрее происходит уплотнение пространственной структуры белка. Поэтому подогрев сгустка для интенсификации отделения сыворотки не требуется.

Окончанием сквашивания принято считать момент, когда сгусток приобретает оптимальные для выработки из него творога кислотность и прочность. Обычно окончание сквашивания устанавливают по излому сгустка и виду сыворотки. При изломе сгустка должен образоваться ровный край с блестящей гладкой поверхностью. Сыворотка, выделяющаяся на месте излома сгустка, должна быть прозрачной и иметь зеленоватый цвет.

При кислотной коагуляции в конце сквашивания сгусток (при производстве творога в ваннах ВК-2,5 и творогоизготовителях марки ТИ-4000) должен иметь кислотность:

- 75 ± 5 °Т – для творога с м.д.ж. 7,0; 9,0 %;
- 80 ± 5 °Т – для творога с м.д.ж. 5,0; 4,0; 3,8; 3,0; 2,0 %;
- 85 ± 5 °Т – для творога обезжиренного.

При кислотно-сычужной коагуляции в конце сквашивания сгусток (при производстве творога на том же оборудовании) должен иметь кислотность:

- 58 ± 5 °Т – для творога с м.д.ж. 23,0 %;
- 61 ± 5 °Т – для творога с м.д.ж. 20,0; 19,0; 18,0; 15,0; 12,0; 9,0 %;
- 65 ± 5 °Т – для творога с м.д.ж. 7,0; 5,0; 4,0 %;
- 68 ± 5 °Т – для творога с м.д.ж. 3,8; 3,0; 2,0 %;
- 71 ± 5 °Т – для творога обезжиренного.

Разницу в кислотности сгустков продукта различной жирности можно объяснить тем, что творог с м.д.ж. 9 и 18 % прессуется долго и набухание белка происходит в процессе прессования. Если же обезжиренный творог разрезать по достижении им той же кислотности, как и для творога с м.д.ж. 9 и 18 %, то он быстро прессуется, набухания не происходит, продукт приобретает крупчатую консистенцию.

При излишней кислотности сгустка образуется мажущая консистенция творога. Продукт имеет кислый вкус и повышенную влажность. При недостаточной

кислотности сгустка формируется крупитчатая, крошливая, грубая, резинистая консистенция творога, слабо выражены кисломолочные вкус и запах. Увеличиваются потери белка, так как его часть переходит в сыворотку. Во избежание повышения кислотности готовый сгусток необходимо быстро обезводить.

Интенсивность отделения сыворотки может зависеть от ряда причин: способа производства творога, температуры пастеризации молока, кислотности сгустка, бактериальной закваски, температуры сгустка во время выделения из него сыворотки.

Материалы и оборудование: молоко коровье, соответствующее ГОСТ 31449; молоко обезжиренное, соответствующее ГОСТ 31658; 40 % раствор хлористого кальция; 1 % раствор сычужного фермента; закваска для творога; закваска для сметаны с вязкой консистенцией; прибор Элекс-7 для определения массовой доли влаги в пищевых продуктах; стеклянные емкости вместимостью 1 л; воронки; лавсановые мешки; термометры; термостат.

Опыт 3.1. Определение физико-химических показателей творога

Определение физико-химических показателей проводят стандартными и общепринятыми методами:

- температуры – по ГОСТ 26754;
- кислотности – по ГОСТ 3624. В фарфоровую ступку вносят 5 г продукта, тщательно перемешивают и растирают пестиком. Затем прибавляют небольшими порциями 50 мл воды, нагретой до 35–40 °С, и три капли фенолфталеина. Смесь перемешивают и титруют раствором щелочи до появления слабо-розового окрашивания, не исчезающего в течение 1 мин.
- *массовой доли жира* – по ГОСТ 5867. Последовательность операций при заполнении жиромера: отвешивают 5 г творога с отсчетом до 0,005 г, добавляют 5 см³ воды, 10 см³ серной кислоты и 1 см³ изоамилового спирта; серную кислоту в жиромер с водой добавляют осторожно, слегка наклонив жиромер; подогревание жиромеров с исследуемой смесью перед центрифугированием проводят в водяной бане при температуре 65±2 °С при частом встряхивании до полного растворения белка.

Опыт 3.2. Определение массовой доли влаги в твороге (по ГОСТ 3626)

Метод основан на выпаривании влаги из тонкослойного образца продукта, находящегося между нагретыми до рабочей температуры плитами нагревательного устройства. В качестве нагревательного устройства применяют прибор Элекс-7.

Для определения массовой доли влаги в продукте пакеты (одно- или двухслойные) из газетной бумаги размером 150x150 мм складывают по диагонали, загибают углы и края примерно на 15 мм. Пакет вкладывают в листок пергамента несколько большего размера, чем пакет, не загибая краев. Готовые пакеты высушивают в приборе в течение 3 мин при температуре 150–152 °С, после чего их охлаждают и хранят в эксикаторе.

Подготовленный пакет взвешивают с погрешностью не более 0,01 г, отвешивают в него 5 г исследуемого продукта с погрешностью не более 0,01 г, распределяя равномерно по всей внутренней поверхности пакета.

Пакет с навеской закрывают, помещают в прибор между плитами, нагретыми до температуры 150–152 °С, и выдерживают 5 мин. В начале сушки во избежание разрыва пакета верхнюю плиту прибора приподнимают и поддерживают в таком положении до прекращения обильного выделения пара. Затем плиту опускают и продолжают высушивание. Пакеты с высушенными пробами охлаждают в эксикаторе 3–5 мин и взвешивают. Массовую долю влаги в твороге вычисляют по формуле.

Ход работы.

В соответствии с массой цельного молока, указанной преподавателем, производят необходимые расчеты массы закваски, сычужного фермента и хлористого кальция.

Заданное количество цельного молока пастеризуют при 80 °С с выдержкой 20–30 с, охлаждают до 32 °С, разливают в стеклянные емкости по 0,5 л. В молоко вносят по 1 % бактериальной закваски: в емкости № 1, 2 и 3 – закваску для творога, придающую сгустку сквашенного молока колющуюся консистенцию, в емкость № 4 – закваску, придающую сгустку вязкую консистенцию.

Затем в емкости № 2 и 3 добавляют 1 % раствор сычужного фермента из расчета 1 г сухого порошка на 1 т молока. В емкость № 3 вносят 40 % раствор CaCl_2 из расчета 400 г сухой соли на 1 т молока. После перемешивания содержимого все образцы заквашенного молока помещают в термостат с температурой 30 °С, где они должны находиться до появления сгустка и достижения кислотности 60–65 °Т. Затем мерные цилиндры с воронками нумеруют и кладут в каждую воронку лавсановый мешочек. Полученные образцы сквашенного молока разрезают таким образом, чтобы на поверхности сгустка получились квадраты со стороной 1 см. Выдержав образцы в покое в течение 30 мин, соблюдая нумерацию стаканов и цилиндров, переносят сгустки в лавсановые мешочки. Отмечают время начала фильтрации сыворотки и через каждые 5 мин записывают ее количество в мерных цилиндрах. После прекращения самопроизвольного отделения сыворотки творог, находящийся в лавсановых мешочках, подпрессовывают, извлекают из них и оценивают по органолептическим и физико-показателям (определяют массовые доли жира, влаги, титруемую кислотность) (табл. 6).

Таблица 6

Динамика отделения сыворотки из творожных сгустков

№ образца	Внесено, см ³			Продолжительность наблюдения, мин											
	за-квас-ки	CaCl ₂	сычуж-ного фермента	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
				Количество выделившейся сыворотки, см ³											
1															
2															
3															
4															

Данные по определению показателей качества творога привести по форме, представленной в таблице 7.

Таблица 7

Характеристика опытных образцов творога

№ образца	Титруемая кислотность, °Т	Массовая доля, %		Органолептические показатели	
		влаги	жира	Вкус и аромат	Консистенция
1					
2					
3					
4					

Контрольные вопросы:

1. Составить технологические схемы производства творога кислотным и кислотно-сычужным способами.
2. Описать методы получения творожных сгустков.
3. Почему образуется мажущая консистенция творога?
4. От чего зависит интенсивность отделения сыворотки?
5. Как определить окончание сквашивания сгустка?
6. Для производства творога, какие подбирают бактериальные закваски?
7. Как протекает сычужная коагуляция белков молока?

Лабораторная работа № 4.

Изучение биотехнологических основ приготовления сыра

Цель работы: освоить биотехнологические процессы приготовления сыра.

Задачи:

- изучить биотехнологию приготовления сыра;
- исследовать образцы молока на брожение;
- исследовать образцы молока по органолептическим свойствам сгустка и по сычужно-бродильной пробе.

Теоретическое обоснование. Сыроварение – один из древнейших биотехнологических процессов, который используется в практической деятельности человека.

Сыр – высокопитательный пищевой продукт, полученный из молока путем ферментативной, кислотной или смешанной коагуляции белков, выделения сырной массы с последующей обработкой и созреванием. Среди продуктов питания сыр занимает одно из первых мест по пищевой и энергетической ценности.

Известны самые разнообразные сыры – от очень мягких до твердых. Различие между ними определяются тем, что все натуральные мягкие сыры содержат много воды – 50-60 %, а твердые – 13-34 %.

Первая стадия – подготовка молока к выработке сыра (контроль качества молока и сортировка, тепловая обработка, вакуумная обработка и т.д.).

Вторая стадия – подготовка молока к свертыванию (применение бактериальных заквасок и концентратов).

Третья стадия – получение и обработка сгустка (свертывание молока, обработка сгустка и сырного зерна).

Четвертая стадия – формирование сыра, самопрессование и прессование сыра, посолка и созревание сыра.

Превращение молока в сыр происходит, как правило, в четыре этапа.

Свертывание молока – речь идет о физико-химических превращениях мицелл казеина под действием протеолитических ферментов и (или) молочной кислоты; эти превращения приводят к появлению сетчатой белковой структуры, называемой сгустком или гелем.

Выделение сыворотки из сгустка - этот этап заключается в выделении молочной сыворотки после разрезки сгустка с помощью формования и в некоторых случаях прессования. В результате получают сырную массу.

Посолка – эта операция состоит в нанесении соли на поверхность сыров или внесении ее в сырную массу, или в погружении сыров в рассол.

Созревание сыра – сложный комплекс микробиологических, биохимических, физико-химических процессов, протекающих в сырной массе. При этом все составные части (молочный сахар, белки, жир, минеральные вещества) претерпевают определенные изменения с образованием различных веществ, формирующих

присущие данному виду сыра органолептические показатели (вкус, запах, консистенция) и рисунок.

Изменение составных частей сырной массы происходят под влиянием главным образом микробных и частично молокосвертывающих ферментов. Максимальное число микроорганизмов накапливается в сыре в первые дни после его выработки. Развитие микроорганизмов продолжается до тех пор, пока остается несброженный молочный сахар. После полного его сбраживания число микроорганизмов постепенно снижается.

При нормальном брожении в сыре образуется рисунок, состоящий из шарообразных пустот (глазков), более или менее равномерно распределенных в массе сыра. У одних сыров (швейцарский) глазки достигают в диаметре 1-2 см, у других (голландский) – 0,3-0,5 см. Глазки образуются в результате накопления в сыре газообразных продуктов.

Требования к качеству молока. Молоко должно иметь чистые вкус и запах, быть без посторонних, не свойственных свежему молоку привкусов и запахов. Молоко не должно содержать значительного количества газообразующей микрофлоры (маслянокислые бактерии, кишечная палочка): кишечная палочка вызывает раннее вспучивание споров, маслянокислые бактерии – позднее вспучивание.

Молоко первого и второго классов для сыроделия пригодно, третьего и четвертого – непригодно, так как в таком молоке могут присутствовать газообразующие бактерии группы кишечной палочки (табл. 8).

Таблица 8

Оценка качества молока по органолептическим свойствам сгустка

Класс	Качество молока	Характеристика сгустка
1	Хорошее	Наблюдается начало свертывания без выделения сыворотки и пузырьков газа; незначительные полоски в сгустке
2	Удовлетворительное	Сгусток с полосками и пустотами, заполненными сывороткой; структура сгустка мелкозернистая; сгусток стягивается со слабым выделением сыворотки
	Плохое	Сгусток с обильным выделением зеленоватой или беловатой сыворотки, сгусток крупнозернистый; наблюдаются пузырьки газа в сгустке или сливочном слое
	Очень плохое	Сгусток разорван и пронизан пузырьками газа, вспучен, как губка

Для определения качественного состава микрофлоры молока, используемого в сыроделии, применяют пробы на брожение и сычужно-бродильную пробу, позволяющие по характеру сгустка судить о присутствии различных микробов в молоке.

Материалы и оборудование: молоко, 100 г сметаны; 100 г сливочного масла; 1-2 яйца; соль; сычужный порошок; стерильные пробирки; ватные пробки; термостат или водяная баня; термометр; кастрюля; электрическая плитка; марля.

Опыт 4.1. Проба на брожение

Проба на брожение применяется для определения пригодности молока для сыроделия. В стерильные пробирки наливают 30-40 мл молока, закрывают ватными пробками и ставят в термостат или водяную баню при температуре 38-40 °С. Через 12 и 24 ч проводят наблюдения, отмечая время свертывания, запах, вкус, кислотность. Молоко считается доброкачественным, если свертывание его не наступило или лишь начинается через 12 ч. Нельзя применять в сыроделии молоко, давшее сгусток со вспучиванием или пузырьками газа.

Опыт 4.2. Сычужно-бродильная проба

В пробирку с 30 мл сычужного фермента вносят 1 мл фермента (0,5 г готового сычужного порошка в 100 мл теплой воды), перемешивают и выдерживают в течение 12 ч при температуре 38-40 °С. Доброкачественное молоко свертывается в течение 20 мин, а через 12 ч дает совершенно однородный плотный сгусток с прозрачной сывороткой. По истечении 12 ч пробы просматривают и относят молоко к одному из трех классов в соответствии с таблицей 9.

Таблица 9

Оценка качества молока по сычужно-бродильной пробе

Класс	Качество молока	Характеристика сгустка
1	Хорошее	Сгусток с гладкой поверхностью, упругий на ощупь, без глазков на продольном разрезе, плавает в прозрачной сыворотке
2	Удовлетворительное	Сгусток с единичными глазками (1-10), мягкий на ощупь, разорван, но не вспучен (не поднялся вверх)
	Плохое	Сгусток с многочисленными глазками, губчатый, мягкий на ощупь, вспучен, всплыл вверх или вместо сгустка наблюдается хлопьевидная масса

Задание: исследовать образцы молока по органолептическим свойствам сгустка и по сычужно-бродильной пробе. Сделать выводы.

Опыт 4.3. Приготовление сыра

В кастрюлю с нагретым почти до кипения молоком (1 л), добавить творог и нагревать на медленном огне, помешивая, пока молоко не свернется. Затем содержимое кастрюли откинуть на марлю или ткань, дать сыворотке стечь, полученную массу вновь выложить в кастрюлю поменьше, которую нужно поставить в водяную баню. Взбить 1-2 яйца со 100 г сметаной и 1 ч. л. соли. Когда творожная масса на водяной бане начинает кипеть, добавить в нее 100 г сливочного масла, а

затем яично-сметанную смесь. Через 10 мин добавить $\frac{1}{4}$ ч. л. соды. Все время, не переставая, перемешивать. Кипятить массу еще 10 мин. В конце добавить 1-2 ч. л. тмина. Как только масса станет однородной и вязкой, и будет отставать от стенок кастрюли, выложить в тарелку, придать форму круга. Придавить небольшим грузом и оставить до остывания, а затем поставить в холодильник. Сделать выводы.

Опыт 4.4. Приготовление Голландского сыра

При выработке Голландского сыра и других с низкой температурой второго нагревания оптимальным режимом пастеризации молока является его нагревание до 71-72 °С с выдержкой в течение 20-25 с.

В охлажденную до температуры свертывания смесь (32-34 °С) вносят бактериальную закваску в количестве 0,5–0,8 % и 40 % раствор хлористого кальция из расчета 40 г безводной соли на 100 кг молока. Хлористый кальций необходимо вносить для восстановления солевого равновесия с целью достижения нормальной продолжительности свертывания и улучшения свойств сычужного сгустка.

Затем в молоко вносят 1 % раствор сычужного порошка или ферментного препарата ВНИИМС, необходимое количество которых для свертывания смеси определяют при помощи прибора для сычужной пробы. Время свертывания устанавливают в пределах 25-30 мин. При отсутствии прибора количество сычужного фермента, необходимое для свертывания молока в заданное время (принимается, что действие фермента строго пропорционально его количеству), определяется по формуле:

$$X = (10 \cdot M \cdot P) / (6 \cdot B),$$

где X - количество 1 % раствора сычужного фермента, мл; M - количество молока, л; B - принятое время свертывания молока, мин; P - продолжительность свертывания 100 см³ подогретого до температуры свертывания молока 10 см³ раствора фермента (отсчет ведут от момента добавления раствора до образования нормального сгустка), с.

Ориентировочно, для свертывания 100 кг молока в течение 25–30 мин доза сычужного фермента составляет 2,5 г препарата стандартной активности.

После внесения раствора сычужного фермента смесь тщательно перемешивают и оставляют в покое до появления сгустка.

Готовность сгустка к разрезке определяют пробой на излом. Для этого шпателем на поверхности сгустка делают надрез, плоской частью шпателя слегка его приподнимают по направлению разреза. Готовый сгусток дает трещину с острыми краями и глянцевой поверхностью, выделяя прозрачную сыворотку.

Готовый сгусток разрезают специальными режущими инструментами на кубики размером 7-8 мм. Разрезку сгустка и постановку зерна ведут 5–10 минут. Скорость зависит от прочности сгустка: нежный сгусток режут медленнее, чтобы не образовывалась сырная пыль, более плотный сгусток режут быстрее. С момента разрезки и до процесса формования зерно должно постоянно перемешиваться во

избежание склеивания.

После разрезки и постановки отбирают 30 % сыворотки (от массы перерабатываемого молока). В сыворотке определяют титруемую кислотность. Результат записывают.

Сырное зерно вымешивают 15–20 мин. Зерно становится более плотным, упругим и округлым. Перед вторым нагреванием отбирают еще 20–30 % сыворотки. В сыворотке определяют титруемую кислотность. Результат записывают.

Для предупреждения развития излишне высокой активной кислотности сыра, обусловленной повышенной первоначальной влажностью или активным развитием молочнокислого процесса, перед вторым нагреванием в смесь сыворотки с зерном вносят 10–15 % пастеризованной воды, температура воды 50–60 °С.

Температура второго нагревания для голландского сыра устанавливается в пределах 39–41 °С в зависимости от качества молока и свойств сырного зерна. Продолжительность нагревания 10–15 мин. Интенсивность нагрева составляет 1 °С в 1 мин. Цель второго нагревания – интенсифицировать процесс выделения сыворотки из зерна.

Для улучшения консистенции сыра и сокращения продолжительности операции посолка, производится частичная посолка сыра в зерне. Соль сорта «Экстра» растворяют в воде, пастеризованной при температуре 80–85 °С и охлаждают до 50–60 °С. Раствор фильтруют и вносят в ванну в конце второго нагревания в виде концентрированного раствора из расчета 200–300 г соли на 100 кг нормализованной смеси молока.

По достижении температуры 41 °С продолжают вымешивание при этой температуре 25–35 мин в зависимости от свойств молока и способности зерна к обезвоживанию. Зерно приобретает округлую форму и уменьшается в размере.

Для получения высококачественного сыра необходимо правильно определить окончание обсушки и готовность сырного зерна к формованию. Зерно должно быть упругим. Если зерно недостаточно обработано, то сыр получается слишком мягким и предрасположен к вспучиванию. При пересушке зерна оно теряет клейкость, сыр плохо формуется, медленно созревает и имеет твердую консистенцию.

Готовность зерна к формованию определяют следующим образом: отбирают из ванны горсть зерна и при сжатии (не очень сильном) в руке зерна должны образовывать комок, который при легком встряхивании должен разламываться, а при легком растирании между ладонями разъединяться на отдельные зерна. Также при пережевывании готового зерна ощущается легкое похрустывание на зубах.

Если зерно готово, отбирают пробу сыворотки для определения ее кислотности. Определяют кислотность и результат записывают.

После обсушки сырного зерна приступают к формованию, которое представляет собой процесс объединения сырных зерен в монолит. Соединение зерен достигается путем их слипания и удаления сыворотки, находящейся между зернами. Голландский

сыр формуют из пласта. Для этого прекращают перемешивание и зерно свободно оседает на дно ванны. Специальной пластиной зерно сдвигают к одному краю и поверхность под слоем сыворотки выравнивают. Высота пласта в производственных условиях соответствует высоте бруска сыра +2 см. В лабораторной выработке высоту устанавливают произвольно, ориентируясь на площадь доньшка формы для сыра. После получения пласта сыворотку сливают, сырный пласт вынимают и укладывают в подготовленную форму. При подготовке формы внутрь укладываются две серпанки (кусоч марли или любого другого дренирующего материала) крест-накрест, помещается сырный пласт и серпанки аккуратно заворачиваются, без образования грубых складок и заломов. Формы закрывают крышками и сыры выдерживают в формах в течение 30 мин для самопрессования. После самопрессования сыры вынимают из форм, переворачивают и снова закладывают в формы, маркируют, заворачивают салфетки и накрывают крышками.

Маркировка всех сыров, кроме советского, производится в центре полотна казеиновыми или пластмассовыми цифрами. Дату изготовления обозначают дробью: в числителе – число, в знаменателе – месяц. Номер выработки указывают справа от даты изготовления.

В период самопрессования продолжается развитие молочнокислого процесса в сырной массе и дальнейшее ее обезвоживание. Исключение стадии самопрессования или недостаточная ее продолжительность затрудняет в дальнейшем при прессовании удаление из сырной массы межзерновой сыворотки. Это происходит вследствие образования при прессовании сыра уплотненного замкнутого поверхностного слоя. Поэтому предварительное самопрессование, а затем и прессование с постепенным увеличением давления до требуемого, способствуют более полному удалению сыворотки из сырной массы.

После самопрессования сыры прессуют под давлением 10 кг в начале и 40 кг на 1 кг сырной массы в конце прессования. Продолжительность прессования сыра 1,5 – 2 часа. Температура в помещении, где производят прессование, должна быть 18–20 °С. Это необходимо вследствие того, что процесс синерезиса прекращается при 16 °С, и для его поддержания при прессовании нужно обеспечивать соответствующий температурный режим.

По окончании прессования, для округления острых граней, сыр без салфеток помещают в формы и выдерживают 20–30 мин.

Опыт 4.5. Приготовление Адыгейского сыра

Материалы и оборудование: 3 литра молока жирностью 2,5 -3,6%; 1 -1,25 л сквашенной сыворотки (3 дня держать при комнатной температуре); 2 ст. л. соли; кастрюля; термометр; марля; дуршлаг или сито.

Ход работы.

1. Молоко в большой кастрюле нагреваем на среднем огне до температуры не менее 82-86 °С, но не более 96 °С. Не кипятим! Во время нагрева обязательно мешаем

по дну, чтобы молоко не прикипело. Чем выше температура молока, тем плотнее получится сыр.

2. Добавляем соль.
3. В отдельной кастрюле нагреваем сыворотку до температуры молока.
4. Как только желаемые температуры молока и сыворотки получены, половником или другим подручным приспособлением начинаем лить сыворотку в молоко. Вливаем сыворотку очень аккуратно - вылили часть, чуть продвинули молоко от краев кастрюли к середине, еще вылили. Так сыворотка достигнет дна ёмкости и быстрее образует сырный сгусток. Сыр ни в коем случае не перемешиваем. Иначе пойдет "зерном" и будет неплотным.
5. Вливаем сыворотку до тех пор, пока сыворотка в молоке не станет прозрачного желто-зеленого цвета. После чего оставляем кастрюлю на очень медленном нагреве около 20-25 минут.
6. Проверяем готовность сыра. Берем сгусток и чуть мнём - если по консистенции напоминает омлет, значит готово.
7. Часть сыворотки с помощью половника сливаем. По максимуму стараемся оставить в кастрюле только сыр.
8. Дуршлаг выстилаем двойным слоем марли, под дуршлаг ставим глубокую тарелку. С помощью шумовки, очень аккуратно перекладываем будущий сыр в дуршлаг.
9. Сгусток ни в коем случае не разрываем, не мешаем, сыворотку в сгусток не льем. Просто вылавливаем все из кастрюли и уплотняем ложкой. Заворачиваем в марлю, помещаем под небольшой пресс и убираем конструкцию в холодильник.
10. Оставляем минимум на 8 -10 часов. Сыр готов.

Контрольные вопросы:

1. Какие используются технологии при производстве сыров?
2. Какие требования предъявляются к качеству молока?
3. Что происходит при свертывании молока?
4. Какие процессы происходят при созревании сыра?
5. Оценка качества молока по органолептическим свойствам сгустка.
6. Оценка качества молока по сычужно-бродильной пробе.

Раздел 2. Продуценты спиртового брожения

Лабораторная работа № 5. Спиртовое брожение, получение спирта при сбраживании углеводов дрожжами

Цель работы: знакомство с компонентами биотехнологического процесса (продуцентами, морфологией дрожжей, режимом и химизмом спиртового брожения).

Задачи:

- ознакомиться с видами дрожжей и строением дрожжевой клетки;
- рассмотреть химизм спиртового брожения;
- изучить продукты спиртового брожения.

Теоретическое обоснование. Явление спиртового брожения давно известно человечеству, однако природа его была раскрыта французским ученым Луи Пастером только в 1858 г., который доказал, что спиртовое брожение сахаристых веществ зависит от жизнедеятельности дрожжевых клеток. Он назвал это явление «жизнь без кислорода» потому, что оно осуществляется в анаэробных условиях. В 1897 г. немецкий ученый Бухнер выделил из дрожжевых клеток ферменты, которые назвал «зимаза», проделал ряд опытов и доказал, что они могут работать вне клеток дрожжей.

Микроорганизмы, участвующие в процессе спиртового брожения:

- *Saccharomyces cerevisiae* - пивные или хлебные дрожжи, длина клетки 8-10 мк, образуют до 6 % спирта (дрожжи верхнего брожения - образуют на поверхности бродящей жидкости пленку и много пены (CO₂), брожение совершается при температуре 14-20 °С. Применяются большей частью в винокурении и хлебопечении. Дрожжи нижнего брожения - оседают на дно, брожение вялое и происходит при температуре 4-10 °С. Применяются в пивоварении;
- *Saccharomyces ellipsoides* - винные дрожжи нижнего брожения, длина клетки 4-6 мк, встречаются в зрелых плодах винограда;
- *Torula* - клетки меньшие, чем *Saccharomyces*, спор не образуют (например, *Torula kephir* - кефирные дрожжи).
- Дрожжи верхнего брожения - образуют на поверхности бродящей жидкости пленку и много пены (CO₂), брожение совершается при t = 14—20 °С. Применяются большей частью в винокурении и хлебопечении.
- Дрожжи нижнего брожения - оседают на дно, брожение вялое и происходит при t = 4—10 °С. Применяются в пивоварении

На рисунке 7 показаны сахаромицеты.

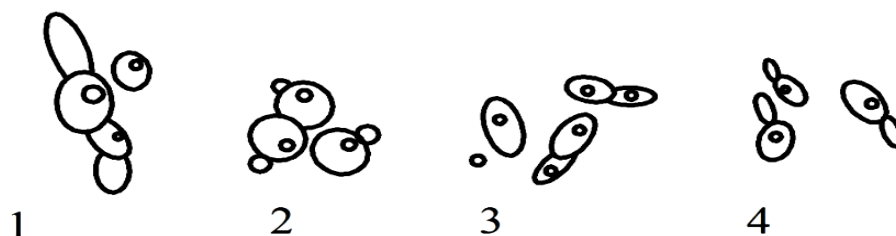


Рисунок 7. Сахаромицеты

1 - пекарские дрожжи; 2 - кормовые дрожжи; 3 - пивные дрожжи; 4 - винные дрожжи

Помимо дрожжей, возбудителями спиртового брожения могут служить и мукоровые плесени (*Mucor javanicum* и др.), гидролизующие крахмал. Существуют и бактерии, вызывающие спиртовое брожение; к ним относятся *Thermobacterium mobile* (сбраживает до 90 % глюкозы) и кислотоустойчивый микроб.

Механизм спиртового брожения. Промежуточным продуктом спиртового брожения является уксусный альдегид, при восстановлении которого образуется этиловый спирт (рис. 8).

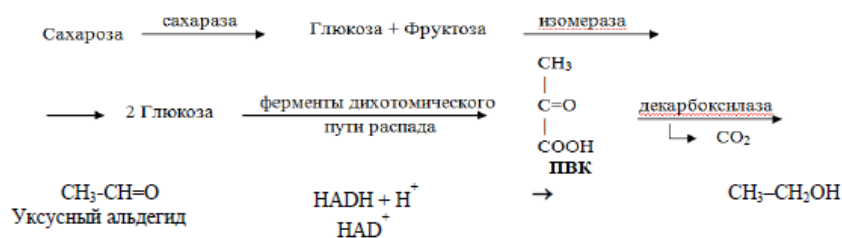
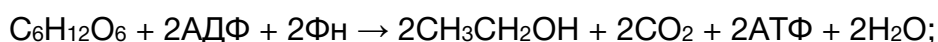


Рисунок 8. Химизм спиртового брожения (упрощенная схема)

Общая схема распада углеводов представлена в приложении 2.

Опыт 5.1. Количественное определение спирта и выделившегося углекислого газа при спиртовом брожении

Суммарное уравнение спиртового брожения:



$G_0' = -156,9$ кДж или сокращенно: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 = 2\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + 2\text{CO}_2$.

Продуктами спиртового брожения являются спирт и углекислый газ в эквимольных соотношениях. Учет образовавшегося углекислого газа производится по убыли в весе колбы, в которой происходило брожение. Учет спирта ведут по одному из методов количественного определения спирта.

Реактивы: дрожжи прессованные; вода дистиллированная; сахароза; танин 5 г; серная кислота; мел; раствор Люголя.

Материалы и оборудование: клапан Бунзена; колбы конические на 200 мл; весы; шпатели; спиртовка; пробирки; штативы; колба Вюрца на 200 мл; перегонная колба; холодильник; аллонж; колба-приемник; лакмусовая бумага; мерный цилиндр.

Ход работы:

Взять две конические колбы на 200 мл, прибавить в обе колбы по 2 г прессованных дрожжей, по 75 мл дистиллированной воды. В опытную колбу добавить 7,5 г сахарозы, закрыть пробками, в которые вставлен клапан Бунзена. (Клапан

Бунзена, пропуская газ под давлением изнутри, не дает возможности наружному воздуху войти внутрь).

Колба, в которой нет сахара, является контрольной. Обе колбы взвешивают на технических весах и оставляют стоять при комнатной температуре. Об окончании брожения удостоверяются по прекращению выделения пузырьков углекислого газа, а также по уменьшению веса колбы, которое в этом случае достигает приблизительно половины веса прибавленного сахара.

Обе колбы снова взвешивают на технических весах. Количество выделившегося углекислого газа определяется по разности между убылью в весе опытной и контрольной колбы (рис. 9).

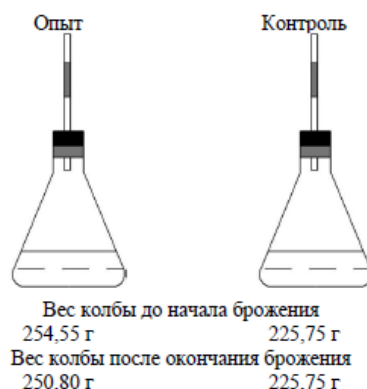


Рисунок 9. Схема опыта

Вес контрольной колбы не изменяется, а вес опытной колбы уменьшился на 3,75 г.

Для более точного определения количества углекислого газа необходимо учесть и то обстоятельство, что после завершения брожения колба заполнена углекислым газом вместо ранее находившегося там воздуха. Поэтому следует определить вес наполняющего колбу углекислого газа (1000 мл CO_2 весят 1,964 г) и ранее бывшего там воздуха (1 л весит 1,293 г), разность между ними прибавить к весу углекислого газа, найденного по уменьшению в весе колбы.

1000 мл воздуха весят 1,293 г.

125 мл воздуха весят X_1 г.

$X_1 = 0,162$ г.

1000 мл CO_2 весят 1,964 г.

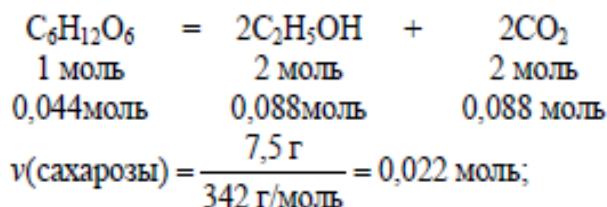
125 мл CO_2 весят X_2 г.

$X_2 = 0,245$ г;

$X_2 - X_1 = 0,245 \text{ г} - 0,162 \text{ г} = 0,083 \text{ г};$

$m(\text{CO}_2) = 3,75 \text{ г} + 0,083 \text{ г} = 3,833 \text{ г}.$

Расчет результатов эксперимента по углекислому газу



$$\nu(\text{глюкозы}) = 0,02 \text{ моль} \cdot 2 = 0,044 \text{ моль.}$$

Согласно уравнению ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 = 2\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + 2\text{CO}_2$), теоретически мы должны получить 0,08 моль углекислого газа и 0,08 моль этилового спирта.

На основании экспериментальных данных находим практический выход углекислого газа.

$$\nu(\text{CO}_2) = \frac{3,833 \text{ г}}{44 \text{ г/моль}} = 0,087 \text{ моль.}$$

Вывод. Практический выход углекислого газа почти совпадает с теоретически рассчитанным выходом.

Рассчитайте выход спирта в вашем опыте спиртового брожения.

Для определения образовавшегося спирта сначала производят отгонку спирта (рис. 10).

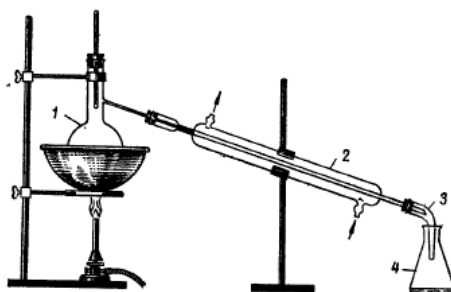


Рисунок 10. Прибор для отгонки спирта:

1 - перегонная колба, 2 - холодильник, 3 - аллонж, 4 - колба-приемник

Ход работы. Содержимое опытной колбы количественно переносят в колбу Вюрца на 200 мл, прибавляют в колбу несколько капель серной кислоты до кислой среды, а для осаждения белков 5 г танина. Затем соединяют колбу с холодильником и отгоняют спирт в приемник. Отгонять следует больше половины жидкости (около 2/3). Затем отгон снова переносят количественно в колбу Вюрца, прибавляют немного мела и еще раз перегоняют спирт. Перегонку оканчивают после отгона приблизительно 2/3 жидкости. Количество отгона измеряют цилиндром или, точнее, мерной колбой, для чего его переносят в мерную колбу (например, на 100 мл) и разбавляют до метки водой. Перегонка с кислотой производится для связывания летучих азотистых продуктов (аммиака, аминов), перегонка с мелом — для связывания летучих органических кислот.

Опыт 5.2. Качественная реакция на этиловый спирт с йодоформом

Чувствительной реакцией на этиловый спирт является так называемая *йодоформная проба*: образование характерного желтоватого осадка йодоформа при действии на спирт йода и щелочи. Этой реакцией можно установить наличие спирта в воде даже при концентрации 0,05 %.

Ход работы.

В раствор дрожжей в количестве 1 мл и добавить раствор Люголя. Раствор Люголя содержит йод (1 часть йода, 2 части йодида калия, 17 частей стерильной дистиллированной воды). К 1 мл раствора йода в растворе йодида калия (можно взять раствор Люголя) добавить по каплям раствор Люголя до слабожелтого окрашивания смеси, затем прилить 1 мл испытуемой жидкости и нагреть, не доводя до кипения. При охлаждении появляется желтый осадок йодоформа (трийодометан) ($C_2H_5OH + 6NaOH + 4I_2 = CHI_3 + HCOONa + 5NaI + 5H_2O$), обнаруживается, кроме того, по запаху.

Контрольные вопросы:

1. Какие химические процессы называются брожением?
2. Назовите виды брожения. Приведите примеры.
3. Дайте определение понятия спиртовое брожение.
4. Какие химические вещества могут быть субстратами спиртового брожения?
5. Приведите примеры использования процессов брожения в природе и промышленности.
6. Назовите сырье и приведите схему получения спирта для медицинских целей.
7. Назовите сырье и приведите схему получения спирта для технических целей.
8. Приведите суммарное уравнение спиртового брожения.
9. Приведите упрощенную схему механизма спиртового брожения.
10. Какую роль играет брожение в круговороте веществ в природе?
11. Схемы получения субстрата для спиртового брожения на основе сульфитного щелока (содержащего гексозаны и пентозаны).
12. Схема получения моносахаридов на основе гидролизата древесины.
13. Определение редуцирующих и сбраживающих веществ.
14. Промышленные способы выделения спирта.

Лабораторная работа № 6. Определение активности амилазы солода по методу Вольгемута

Цель работы: ознакомиться с биокатализаторами (ферментами) в биотехнологических процессах.

Задачи:

- ознакомиться с механизмом действия ферментов и роли третичной структуры белка в образовании активного центра фермента;
- определить активность амилазы при гидролитическом расщеплении крахмала.

Теоретическое обоснование: Ферменты - органические вещества белковой природы, которые синтезируются в клетках и во много раз ускоряют протекающие в них реакции, не подвергаясь при этом химическим превращениям (биокатализаторы). Определение «фермент» впервые было предложено голландским исследователем Ван-Гельмонтом, который назвал так вещество, благодаря которому происходит спиртовое брожение. В 1871 г. немецкий химик Бюхнер опытным путем доказал, что ферменты могут находиться и вне живых клеток. В дальнейшем внеклеточные ферменты получили название «энзим».

В 1902 г. Генри выдвинул предположение, что действие ферментов заключается в образовании комплекса с молекулой субстрата, которое представляет собой обратимый процесс. Комплекс «фермент - субстрат» соответствует промежуточному соединению или переходному состоянию в теории промежуточных соединений. Затем этот комплекс распадается и регенерирует фермент. Данный процесс описывается уравнением Михаэлиса-Ментен:



где E - фермент, S - субстрат, ES - комплекс, P - продукт реакции.

Согласно существующим воззрениям, молекула субстрата связывается с областью на поверхности фермента, которая называется *активным центром* (рис. 11).

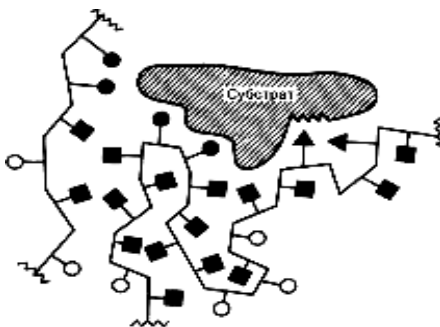


Рисунок 11. Субстрат-ферментный комплекс

Активность этого центра повышается в присутствии витаминов и некоторых минеральных веществ. За активность ферментов особенно ответственны различные микроэлементы, в частности d -переходные металлы, как, например, медь, марганец, железо и никель.

Активность некоторых ферментов зависит от наличия *коферментов*. Коферментами являются относительно небольшие органические молекулы, которые связываются с активными центрами фермента. Роль таких коферментов часто выполняют витамины группы В. На рисунке 12 схематически изображен принцип действия кофермента.

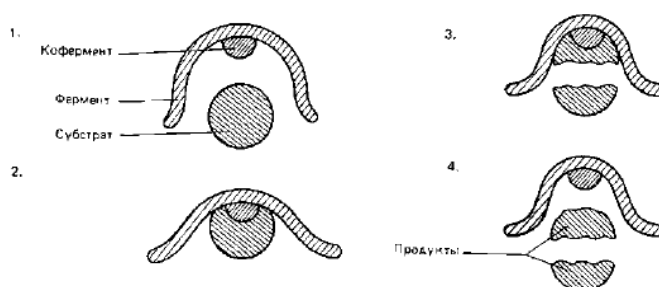


Рисунок 12. Схематическое изображение связывания молекулы субстрата с ферментом и коферментом

После завершения реакции продукты отделяются от фермента, освобождая его для связывания со следующей молекулой субстрата.

Ферменты широко применяются в биотехнологическом производстве (табл. 10).

Таблица 10

Ферменты, извлекаемые из плесневых грибов для промышленного использования

Фермент	Субстрат	Микроорганизмы	Применение в промышленности
Амилаза	Крахмал	<i>Asp. niger</i> , <i>Pen. camamberti</i>	Хлебопечение - частичное осахаривание крахмала для роста дрожжей. В спиртовой - амилазы используют вместо солода. В пивоварении для получения растворимого крахмала.
Целлобиаза	Целлюлоза	<i>Asp. niger</i>	Для осахаривания растительных отходов в животноводстве, в кожевенной - обработка шкур.
Инвертаза	Сахароза	<i>Asp. niger</i> , <i>Pen. camamberti</i>	Пищевая - получение фруктового сиропа.
Липаза	Жиры	<i>Asp. oryzae</i>	Шелковая - для очистки шелка. Сельское хозяйство - для усвояемости кормов.
Мальтаза	Мальтоза	<i>Asp. niger</i> , <i>Pen. camamberti</i>	Пищевая - гидролиз мальтозы.
Протеаза	Белки	<i>Asp. niger</i> , <i>Pen. camamberti</i>	Пищевая - гидролиз белков.
Пектиназа	Пектиновые вещества	<i>Asp. niger</i> , <i>Pen. camamberti</i>	Текстильная - при мочке льна.
Лактаза	Молочная сыворотка	<i>Asp. oryzae</i>	Пищевая - получение глюкозы.

Примечание: помимо грибных, есть и бактериальные амилазы, протеазы, вообще в настоящее время широко применяются бактериальные ферменты и ферменты актиномицетного происхождения (*Streptomyces griseus*, *Streptomyces*, *Bac. subtilis*).

Метод Вольгемута основан на определении минимального количества фермента, способного при определенных условиях полностью гидролизовать 1 мл 0,1 % раствора крахмала. Амилазная активность солода выражается количеством миллилитров 0,1 % раствора крахмала, которое может быть гидролизано 1 мл вытяжки из солода при температуре 38 °С в течение 30 мин. В норме амилазная активность равна от 160 до 320 единиц активности. Метод Вольгемута широко используется в клинической медицине, в пивоварении - для определения амилазной активности солода.

Материалы и реактивы: вытяжка из солода зерновых, разбавленная в 10 раз; 0,1 % раствор крахмала; 0,1 % раствор йода в 0,2 % растворе иодида калия.

Опыт 6.1. Определение активности амилазы солода по методу Вольгемута

Ход работы.

В десять пробирок наливают по 1 мл дистиллированной воды. В первую пробирку прибавляют 1 мл разведенной в 10 раз вытяжки, перемешивают, 1 мл смеси переносят во вторую пробирку. Содержимое этой пробирки снова перемешивают и 1 мл переносят в третью пробирку и так до десятой пробирки. Из последней пробирки отбирают 1 мл и выливают. Таким образом, в каждой последующей пробирке содержание фермента в два раза меньше, чем в предыдущей. Разведение вытяжки в десяти пробирках составит: 1:10; 1:20; 1:40; 1:80; 1:160; 1:320; 1:640; 1:1280; 1:2560; 1:5120; 1:10240 (табл. 11).

Таблица 11

Результаты определения активности амилазы

Номер пробирки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Разведение вытяжки	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240
Окраска с йодом										

Далее во все пробирки прибавляют по 1 мл воды и по 2 мл раствора крахмала, перемешивают и помещают в термостат при температуре 38 °С на 30 минут.

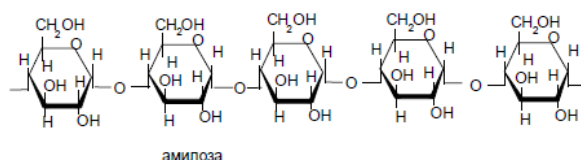
После инкубации пробирки охлаждают водопроводной водой для прекращения действия фермента, добавляют по две капли раствора йода, хорошо взбалтывают и наблюдают за изменением окраски. При реакции с йодом жидкость окрашивается в желтый, розовый и фиолетовый цвет. Отметив, при каком разведении произошел полный гидролиз крахмала с минимальным содержанием фермента (пробирка с желтоватой окраской содержимого), по количеству неразведенной вытяжки (*A*) в

данной пробирке рассчитывают амилазную активность вытяжки (А мл вытяжки расщепляет Х мл 0,1 % раствора крахмала).

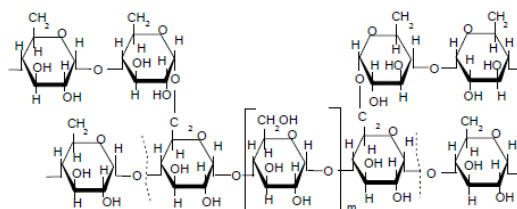
Пример: желтый цвет появился в четвертой пробирке, где вытяжка разведена в 160 раз. Это количество вытяжки способно гидролизовать 2 мл 0,1 % раствора крахмала, а 1 мл неразведенной вытяжки в тех же условиях гидролизует 320 мл: $X = 2 \times 160/1$. Следовательно, амилазная активность равна 320.

Контрольные вопросы:

1. Напишите схему кислотного гидролиза крахмала на примере амилозы и схему продукта гидролиза с реактивом Фелинга.



2. Напишите схему ферментативного гидролиза крахмала в присутствии амилазы на примере амилопектина, если в этом случае продукт гидролиза мальтоза.



Лабораторная работа № 7. Технологическая схема производства кормовых дрожжей, их состав и качественные реакции

Цель работы: ознакомиться с составом кормовых дрожжей и химизмом процессов их продуцирования дрожжами рода Кандида.

Задачи:

- ознакомиться с биотехнологической системой продуцирования белка на основе моносахаридов в клетках дрожжей (цикл Кребса, его роль).
- провести качественные реакции на органические вещества, присутствие в кормовых дрожжах.

Теоретическое обоснование. I. Субстратом - источником углерода являются три вида гидролизатов.

Гидролизат (раствор, полученный после гидролиза полисахаридов, содержащий пентозы и около 80 % гексоз).

Барда (раствор после отделения из культуральной жидкости спирта при спиртовом производстве, содержащий пентозы, поскольку спиртовые дрожжи

усваивали гексозы, продуцируя спирт). Барда гидролизно-спиртовых заводов содержит 0,6-0,7 % редуцирующих веществ (РВ), или 0,4-0,6 % моносахаридов, состоящих почти исключительно из пентоз.

Смесь барды и гидролизата. Барда – более ценное сырье, поскольку содержит биостимуляторы, больше микроэлементов, а вредные примеси были адсорбированы спиртовыми дрожжами. Субстраты характеризуются показателями РВ и СВ (сбраживающие вещества) (табл. 12).

Таблица 12

Показатели, характеризующие субстрат

Субстрат	Редуцирующая способность, %	Сбраживающие вещества, %
Гидролизат, подготовленный к биохимической обработке, - сусло (нейтрализация, удаление примесей, аэрирование)	РВ 3-4 % Редуцирующие вещества – содержание сахаров, рассчитанное по количеству осадка оксида меди (I) в реакции с реактивом Фелинга	СВ Сбраживающие сахара (субстрат подвергают брожению и по количеству продукта рассчитывают количество исходных сахаров для его получения)

Другие компоненты питательной среды. Перед использованием для выращивания кормовых дрожжей водные растворы пентозных и гексозных сахаров должны быть обогащены азотом, фосфором, а иногда калием. Азот прибавляют в виде аммиака или сернокислого аммония, содержащего 19-21 % аммиачного азота. Иногда для этой же цели используют мочевины. Фосфор обычно вводят в виде водной вытяжки из суперфосфата. На выращивание 1 т абсолютно сухих кормовых дрожжей расходуется 450 кг сернокислого аммония, 266 кг суперфосфата и 51 кг хлористого калия. Поскольку часть азота, фосфора и калия теряется в производстве, общий расход питательных веществ увеличивается по сравнению с приведенным на 10 %. На рисунке 13 представлено строение почкующейся дрожжевой клетки.

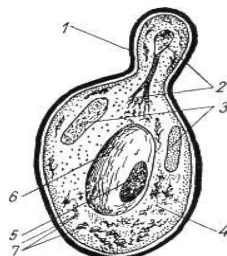


Рисунок 13. Строение почкующейся дрожжевой клетки:

1 – оболочка; 2 – делящееся ядро; 3 – гликоген; 4 – цитоплазма; 5 – волютин; 6 – вакуоль; 7 – митохондрии

II. Продуценты производства кормового белка — клетки эукариоты (рис. 14).

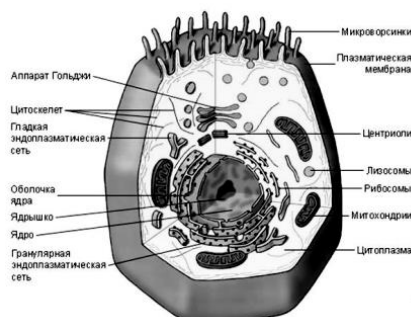


Рисунок 14. Строение клетки эукариот

Клеточная стенка имеет толщину 30-250 нм, эластичная, с возрастом утолщается, содержимое - протопласт. Цитоплазматическая мембрана (плазмолемма) проницаема избирательно.

Цитоплазма - внутреннее содержимое клетки - водная коллоидная система (термодинамически неравновесная система, в которой вещество диспергировано до размеров 1-200 нм и более): белки, нуклеиновые кислоты, аминокислоты, углеводы, липиды, минеральные вещества (происходят биохимические процессы). *Эндоплазматическая сеть* - сложная мембранная система, разделяющая цитоплазму на множество отсеков. *Аппарат Гольджи* - плоские цистерны и пузырьки, размещенные по краям цистерн, выделяемые из клетки в окружающую среду. *Лизосомы* - сферические образования, ограниченные мембраной, содержат комплекс ферментов гидролиза белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов. *Рибосомы* (РНК + белок) в клетках прокариот расположены свободно, а у дрожжей в виде полисом по 5-6 рибосом. *Митохондрии* - нитевидные зерна длиной 7 мкм. Это самые большие образования после ядра. Они отделены от цитоплазмы двойной мембраной, внутренняя с многочисленными складками, на ней ферменты ЭТС (электронно-транспортной системы). *Ядро* - ДНК ассоциирована с белками и, складываясь многократно, образует хромосомы. У дрожжевой клетки 8-12 хромосом. *Вакуоли* отделены от цитоплазмы тонопластом (мембраной), они содержат липиды, минеральные соли, ферменты. В цитоплазме дрожжевой клетки содержатся включения жира, гликогена. Различные виды дрожжевых клеток представлены на рисунке 15.

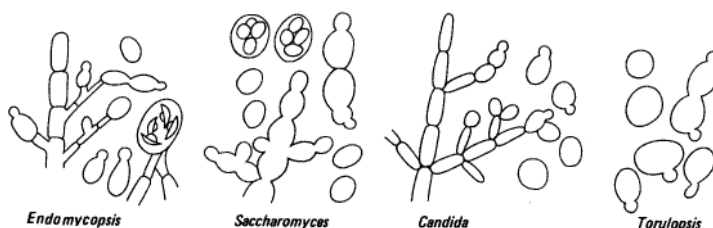


Рисунок 15. Клетки дрожжей

III. Технологический режим производства кормовых дрожжей: непрерывное глубинное культивирование дрожжей в ферментаторе, 35-45 °C, pH = 4,6 - 4,8, аэрирование.

IV. Отделение кормовых дрожжей от культуральной жидкости. Клетки кормовых дрожжей по размерам в несколько раз меньше сахаромикетов и фильтруются плохо, так как практически сразу забивают поры фильтра. Поэтому для отделения биомассы используют *сепарирование*. Эта стадия основана на осаждении взвешенных частиц под действием центробежной силы работающего агрегата - сепаратора. Основной его частью является вращающийся ротор, который и позволяет осаждать из суспензий взвешенные частицы, включая микробные клетки, таким образом в несколько ступеней удастся довести концентрацию клеток только до 10-12 %, что недостаточно для получения товарной формы продукта. В дальнейшем сгущенную суспензию клеток подвергают выпариванию под вакуумом и сушке распылением в токе горячего воздуха. Готовый продукт содержит инаktivированные (мертвые) клетки дрожжей и часть веществ из культуральной жидкости. После плазмолиза масса подвергается сушке и прессованию (рис. 17).



Рисунок 17. Кормовые дрожжи прессованные

V. Состав кормовых дрожжей. В состав белка дрожжей входят почти все необходимые для нормального роста животных и птиц аминокислоты, как-то: тирозин, триптофан, метионин, треанин, аргинин, гистидин, лизин, изолейцин, лейцин и валин.

Гликоген, или животный крахмал, является сильно разветвленным резервным полисахаридом, состоящим из остатков глюкозы. Основную массу золы дрожжей составляют фосфор и калий.

В сухом веществе дрожжей содержится 8-9 % связанного азота и 3,8 - 6,5 % P_2O_5 . Особенно большую ценность представляют содержащиеся в дрожжах витамины.

Характеристика продукта: 50-60 % белка, до 5 % жиров, 10-22 % углеводов, 10 % золы, 6-10 % воды.

Опыт 7.1. Определение наличия живых клеток дрожжей

В стерильную коническую колбу вместимостью 250 см³ из пробы, отобранной фламбированным шпателем, берут навеску продукта массой 10 г, взвешенную с погрешностью 0,001 г, заливают стерильными 90 см³ физиологического раствора или водопроводной воды, тщательно перемешивают и инкубируют колбу при

температуре 30-32 °С в течение 18-22 ч. Из колбы 1 см³ суспензии вносят в чашку Петри и заливают расплавленным и охлажденным до температуры 40-45 °С сусло-агаром, осторожно перемешивая. После застывания агар-агара чашки Петри переворачивают крышками вниз и инкубируют в термостате при температуре 36-38 °С в течение 48 ч. Оценку результатов проводят через 48 ч.

Опыт 7.2. Определение запасных веществ (гликогена, волютина) в клетках дрожжей

Основными запасными веществами дрожжевой клетки являются гликоген и волютин (зерна метакроматина).

Для определения гликогена на предметное стекло наносят каплю разбавленной дрожжевой суспензии и каплю 0,5 % раствора йода. Через 2-3 мин цитоплазма клеток окрашивается в светло-желтый цвет, а гранулы гликогена - в красно-бурый. Препарат накрывают покровным стеклом, удаляют излишек жидкости фильтровальной бумагой и микроскопируют. Учитывают также упитанность дрожжей по гликогену: в нормальных дрожжах гликоген занимает от 1/3 до 2/3 объема клетки. Если гликогена меньше 1/4 объема клетки, его содержание считается недостаточным.

Гликоген – запасной полисахарид дрожжевой клетки. По содержанию гликогена судят об упитанности дрожжей. Если гликогена в дрожжах мало, то это свидетельствует о том, что они длительное время находились без питательного субстрата и имеют поэтому низкую бродильную активность. В клетках животных гликоген – основной резервный полисахарид. Разветвленная структура гликогена обуславливает большое количество концевых мономеров, что способствует работе ферментов, отщепляющих или присоединяющих мономеры при распаде или синтезе гликогена, так как эти ферменты могут одновременно работать на нескольких ветвях молекулы (рис. 18).

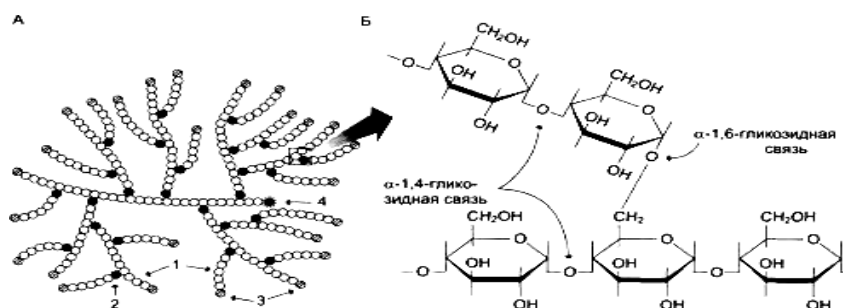


Рисунок 18. Структура гликогена

Волютин – запасной полифосфат в соединении с простыми белками и рибонуклеиновой кислотой. В состоянии активного обмена волютин в клетках дрожжей располагается мелкими каплями по стенкам вакуолей или непосредственно под клеточной стенкой. В больших количествах волютин накапливается перед почкованием. Накопление волютина особенно интенсивно

происходит при выращивании дрожжей на средах, богатых фосфатами.

Контрольные вопросы:

1. Схема гидролиза целлюлозы в присутствии серной кислоты.
2. Перечислить стадии подготовки сусла.
3. Схема гидролиза пентозанов и гексозанов.
4. Строение дрожжевой клетки, функции органоидов.
5. Этапы синтеза белка в клетке дрожжей рода Кандида с участием нуклеиновых кислот.
6. Цикл Кребса (субстраты).
7. Схема получения белка из органических кислот на примере одной из кислот, входящих в цикл Кребса по генетическому коду.
8. Строение дрожжевой клетки (эукариоты).
9. Ферменты, участвующие в синтезе белка (в каких образованиях клетки они сосредоточены).
10. Роль рибосом, ДНК, РНК.

Лабораторная работа № 8. Изучение биотехнологии кваса

Цель работы – закрепить теоретические знания технологического процесса производства кваса, приобрести практические навыки оценки органолептических и физико-химических показателей качества продукта.

Задачи:

- изучить основные технологические операции процесса производства кваса.
- приготовить квас.
- определить органолептические и физико-химические показатели кваса: массовую долю сухих веществ, содержание спирта, кислотность.

Теоретическое обоснование. Согласно ГОСТ 31494-2012 «Квасы. Общие технические условия», квас – это безалкогольный напиток с объемной долей этилового спирта не более 1,2 %, изготовленный в результате незавершенного спиртового или спиртового и молочнокислого брожения сусла.

Сусло может быть приготовлено из растительного сырья или продуктов его переработки, сахара, фруктозы, декстрозы, мальтозы, сиропа глюкозы и других натуральных сахаросодержащих веществ с последующим добавлением или без добавления пищевых добавок.

Квас обладает отличными вкусовыми качествами, хорошо утоляет жажду. Квас, как продукт кисломолочного брожения, по действию на организм во многом подобен таким продуктам, как кефир, простокваша, ацидофилин, кумыс. Он регулирует деятельность желудочно-кишечного тракта и сердечно-сосудистой системы,

улучшает обмен веществ, препятствует развитию болезнетворных микроорганизмов, поднимает тонус. Квас содержит витамины, свободные аминокислоты, сахара и микроэлементы, обладает высокой энергетической ценностью.

Хлебные квасы брожения – хлебный и окрошечный составляют более 90 % общего количества квасов. В качестве сырья для их производства используют концентрат квасного сусла и сахарный сироп.

Концентрат квасного сусла получают в результате затирания с водой ржаного и ячменного солодов, ржаной муки и свежепроросшего ферментированного и неферментированного ржаного солода с применением ферментных препаратов и последующим осахариванием затора, его фильтрацией, осветлением сусла и упариванием в вакуум-выпарных аппаратах с последующей термообработкой.

Согласно требованиям действующей нормативно-технической документации, готовый хлебный квас брожения должен содержать от 5,4 до 5,8 % сухих веществ, а окрошечный – от 3,0 до 3,2 %. Кислотность этих квасов должна быть в пределах от 1 до 7 °Т, содержание спирта от 0,4 до 0,6 мас. %. Эти квасы должны быть коричневого цвета, непрозрачными, с небольшим осадком частиц хлебных припасов и дрожжей, кисло-сладким на вкус, с приятным ароматом ржаного хлеба.

Материалы: концентрат квасного сусла (ККС); сахар; суспензия дрожжей (5 г на 100 см³ воды); суспензия молочнокислых микроорганизмов (0,1 г лактобактерина на 100 см³ воды); этиловый спирт; гидроксид натрия, 0,1 моль/дм³ раствор; фенолфталеин 1 % спиртовой раствор; дистиллированная вода.

Оборудование: сахаромеры со шкалой измерения 0 – 5, 0 – 10, 0 – 15, 60 – 65 % сухих веществ (СВ); термометр; электрическая плитка; технические весы; водяная баня; секундомер; бюретка на 5 мл с ценой деления 0,02 см³; стеклянные цилиндры на 50, 100, 500 см³; стеклянные конические колбы на 200–250 см³; мерные колбы на 100, 500 см³; стеклянный холодильник; стеклянные стаканы на 150–200, 700–800 см³; стеклянная воронка средних размеров; плоскодонная колба на 500 см³; конические колбы на 150, 250 см³; широкогорлые конические колбы на 300–500 см³; стеклянные широкогорлые бутылки с крышкой на 1 дм³; каплеуловитель; пикнометры на 50 см³; пипетки на 10 см³; цилиндр мерный на 500 см³; чашка для упаривания; вата; лед; лакмусовый индикатор.

Опыт 8.1. Приготовление кваса из концентрата квасного сусла

Производство хлебного кваса на основе готового концентрата квасного сусла состоит из следующих основных операций: подготовки сырья, приготовления квасного сусла, брожения сусла и купаживания сброженного сусла сахарным сиропом и концентратом квасного сусла.

Расход сырья на приготовление кваса различных сортов приведен в таблице 13 (в кг на 1000 л кваса).

Таблица 13

Расход сырья на приготовление кваса

Наименование сырья	Массовая доля СВ в сырье, %	Квас	
		Хлебный	Окрошечный
Сахар	99,86	50,0	30,0
Концентрат квасного сусла	70*	29,4*	21,5*
Дрожжи хлебопекарные	25	0,15	0,15
Молочнокислые бактерии	90	0,003	0,003

Оценка качества концентрата квасного сусла.

Качественные показатели концентрата квасного сусла должны соответствовать следующим требованиям. По внешнему виду это вязкая, густая жидкость темно-коричневого цвета. Вкус кисло-сладкий с незначительно выраженной горечью. Имеет аромат ржаного хлеба.

Массовая доля сухих веществ в концентрате должна быть 70 ± 2 %, кислотность 16 – 40 °Т.

При растворении концентрата квасного сусла в воде допускаются опалесценция и осадок не более 1 % по объему. Присутствие консервирующих веществ и механических примесей не допускается.

Вкус и аромат определяют органолептически, для чего концентрат квасного сусла разводят питьевой водой, имеющей температуру 20 °С в массовом отношении 1:30.

Опыт 8.2. Определение массовой доли сухих веществ концентрата квасного сусла (ККС) пикнометром

Ход работы.

Концентрат квасного сусла разбавляют водой в массовом соотношении 1:4. Для этого в сухой, предварительно взвешенный химический стакан вместимостью 150–200 см³ помещают 20 или 40 г концентрата, отвешенного с точностью до 0,01 г, и, не снимая стакана с весов, доводят его содержимое дистиллированной водой до 100 или 200 г.

Смесь тщательно перемешивают стеклянной палочкой до полного растворения навески и с помощью пикнометра определяют относительную плотность раствора при 20 °С.

Относительную плотность ККС (d), вычисляют с точностью до четвертого знака после запятой по формуле:

$$d = (m_3 - m_1) / (m_2 - m_1),$$

где m_1 – масса пустого пикнометра, г; m_2 – масса пикнометра с водой, г; m_3 – масса пикнометра с разведенным концентратом квасного сусла, г.

По рассчитанной относительной плотности в приложении 5 находят массовую долю СВ в исследуемом растворе, а умножением полученной величины на пять определяют массовую долю СВ в концентрате.

Опыт 8.3. Определение массовой доли сухих веществ ККС сахаромером

Ход работы.

Концентрат квасного сусла разбавляют водой с температурой 20 ± 5 °С в массовом соотношении 1:4. Для этого в сухой, предварительно взвешенный химический стакан вместимостью 700 – 800 см³ помещают 100 г концентрата, взвешенного с точностью до 0,01 г, и, не снимая стакана с весов, доводят его содержимое дистиллированной водой до 500 г.

Смесь тщательно перемешивают стеклянной палочкой до полного растворения навески, после чего опускают в нее сухой сахаромер. Через 2 - 3 мин производят отсчет по верхнему краю мениска.

Затем измеряют температуру раствора и, если она отлична от 20 °С, вносят соответствующую поправку к показаниям сахаромера на температуру, пользуясь таблицей 14.

Таблица 14

Поправки к показанию сахаромера

Температура, °С	Массовая доля сухих веществ, %				
	5	10	15	20	25
15	Из показания сахаромера вычитают				
	0,21	0,24	0,26	0,28	0,30
	0,18	0,19	0,21	0,23	0,24
	0,13	0,15	0,16	0,17	0,18
	0,09	0,10	0,11	0,12	0,12
	0,05	0,05	0,06	0,06	0,06
21	К показанию сахаромера прибавляют				
	0,05	0,06	0,06	0,06	0,06
	0,11	0,11	0,12	0,12	0,13
	0,16	0,17	0,18	0,19	0,20
	0,22	0,23	0,24	0,26	0,26
	0,28	0,30	0,31	0,32	0,33

Умножением полученной величины на пять определяют массовую долю сухих веществ в ККС.

Вычисления проводят с точностью до второго знака после запятой с последующим округлением.

Опыт 8.4. Определение кислотности ККС

Ход работы.

В химическом стакане с точностью до 0,01 г взвешивают 5 г концентрата квасного сусла, с помощью дистиллированной воды количественно переносят навеску в мерную колбу вместимостью 100 см³, содержимое колбы доводят до метки и тщательно перемешивают.

Пипеткой переносят по 10 см³ полученного раствора в две широкогорлые конические колбы вместимостью 300 – 500 см³ и приливают по 250 см³ воды в каждую. В одной из колб ведут титрование раствором NaOH концентрацией 0,1 моль/дм³ с индикатором фенолфталеином до появления заметного розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 с. Содержимое второй колбы служит эталоном для сравнения окраски.

Кислотность концентрата квасного сусла ($K_{\text{ККС}}$) выражают в к.ед. (кислотная единица, к. ед.: единица кислотности квасного сусла, эквивалентная 1 см³ раствора гидроокиси натрия концентрацией 1 моль/дм³ на 100 г концентрата). Расчет производят по формуле:

$$K_{\text{ККС}} = V \cdot K \cdot V_1 \cdot 100 / (V_2 \cdot M_{\text{ККС}} \cdot 10),$$

где V - количество раствора NaOH концентрацией 0,1 моль/дм³, пошедшего на титрование, см³; K - поправочный коэффициент раствора щелочи; V_1 - вместимость колбы, в которой разводили концентрат, см³; V_2 - объем раствора концентрата, взятого для титрования, см³; $M_{\text{ККС}}$ - навеска концентрата, г; 10 - коэффициент пересчета раствора NaOH концентрацией 0,1 моль/дм³ на раствор NaOH концентрацией 1 моль/дм³.

Опыт 8.5. Определение растворимости и величины осадка ККС

Ход работы.

В химическом стакане с точностью до 0,01 г взвешивают 2 г концентрата квасного сусла и растворяют его в небольшом количестве воды. Раствор количественно переносят в измерительный цилиндр вместимостью 100 см³, доливают до верхней метки дистиллированной водой, тщательно перемешивают и оставляют на 2 ч при температуре 18-20 °С. Отстоявшийся раствор концентрата квасного сусла рассматривают в проходящем свете и определяют величину образовавшегося осадка.

Результаты определения качественных показателей концентрата квасного сусла заносят в таблицу.

Показатели качества концентрата квасного сусла

Наименование показателей ККС	Характеристика, числовое значение
Внешний вид	
Вкус	
Аромат	
Цвет	
Массовая доля сухих веществ, %	
Кислотность, к.ед.	
Величина осадка, % по объему	

Приготовление квасного сусла. При изготовлении квасного сусла 70 % ККС расходуют на процесс брожения, 30 % – добавляют при купажировании кваса.

Массовая доля сухих веществ в квасном сусле (до внесения сахарного сиропа) для хлебного кваса должна составлять 1,4 %, для окрошечного – 1,0 %. Рассчитывают массу ККС, необходимого для приготовления заданного объема квасного сусла по формуле:

$$M_{\text{ККС}} = V_{\text{КС}} \cdot \rho_{\text{КС}} \cdot \text{СВ}_{\text{КС}} / \text{СВ}_{\text{ККС}},$$

где $M_{\text{ККС}}$ – масса ККС, г; $V_{\text{КС}}$ – объем квасного сусла мл; $\text{СВ}_{\text{КС}}$ – массовая доля сухих веществ квасного сусла, %; $\text{СВ}_{\text{ККС}}$ – массовая доля сухих веществ ККС, %; $\rho_{\text{КС}}$ – плотность квасного сусла (прил. 1), г/см³.

Объем (массу) воды $V_{\text{В}}$, см³ (г), необходимой для приготовления квасного сусла, рассчитывают по формуле:

$$V_{\text{В}} = V_{\text{КС}} \cdot \rho_{\text{КС}} - M_{\text{ККС}}.$$

В цилиндр наливают рассчитанное количество воды с температурой 30 – 35 °С. В стаканчике взвешивают необходимое количество ККС и теплой водой из цилиндра с помощью стеклянной палочки количественно переносят концентрат квасного сусла в колбу для приготовления сусла, затем туда же выливают оставшуюся воду.

Приготовление сахарного сиропа. Сахарный сироп представляет собой концентрированный водный раствор сахара. Массовая доля сухих веществ в нем должна быть в пределах 60–65 %. В таблице 15 указана плотность сахарного сиропа в зависимости от содержания в нем сухих веществ.

Таблица 15

Плотность сахарного сиропа с различным содержанием сухих веществ

Массовая доля СВ в сахарном сиропе, %	60	61	62	63	64	65
Плотность сахарного сиропа, г/см ³	1,2894	1,2950	1,3010	1,3058	1,3102	1,3190

Из двух возможных способов приготовления сахарного сиропа (холодного и горячего) в данной работе предлагается выбрать холодный, так как сироп используется сразу же после приготовления.

Опыт 8.6. Определение расхода сахара и воды на приготовление 100 см³ сиропа, содержащего 65 % сухих веществ

Рассчитать расход сахара и воды на приготовление 100 см³ сиропа, содержащего 65 % сухих веществ.

Пример 1.

1. Масса 100 см³ сиропа составляет:

$$M_{\text{сир}} = 100 \cdot 1,3190 = 131,9 \text{ г},$$

где 1,3190 – плотность сиропа, г/см³.

2. Масса сахара в сиропе:

$$M_{\text{сах}} = 131,9 \cdot 65 / 100 = 85,74 \text{ г},$$

а с учетом влажности товарного сахара:

$$M_{\text{сах..вл}} = 85,74 \cdot 100 / 99,86 = 85,85 \text{ г},$$

где 99,86 – содержание СВ в товарном сахаре, %.

3. Расход воды на приготовление сиропа:

$$M_{\text{в}} = 131,90 - 85,85 = 46,05 \text{ г (мл)}.$$

Приготовленный сахарный сироп необходимо внести в квасное сусло из расчета 25 % сахара, предусмотренного рецептурой.

Пример 2. Рассчитать какое количество сахарного сиропа, содержащего 65 % СВ, необходимо внести в квасное сусло для приготовления хлебного кваса (масса концентрата квасного сусла с содержанием СВ 70 % при смешении его с водой составила 20 г).

1. Так как на процесс брожения при изготовлении квасного сусла идет 70 % ККС, общее количество концентрата квасного сусла составляет:

$$M_{\text{ККС}} = 20 \cdot 100 / 70 = 28,6 \text{ г}.$$

2. Масса сахара, которая в соответствии с рецептурой приходится на это количество ККС:

$$M_{\text{сах.рец}} = 28,6 \cdot 50 / 29,4 = 48,6 \text{ г}.$$

3. Масса сахара, вносимого в квасное сусло до брожения составляет (25 %):

$$M_{\text{сах.бр}} = 48,6 \cdot 25 / 100 = 12,2 \text{ г}.$$

4. Объем сиропа, который следует добавить к квасному суслу:

$$V_{\text{сир}} = 12,2 \cdot 100 / 85,74 = 14,2 \text{ см}^3,$$

где 85,74 – масса сахара в 100 см³ сиропа.

Сусло с сахарным сиропом тщательно перемешивают, нагревают до кипения, кипятят в течение 10 мин, охлаждают до температуры 20 °С и определяют содержание в нем сухих веществ с помощью рефрактометра.

Массовая доля сухих веществ в сусле для хлебного кваса должна составлять 2,5 %, для окрошечного – 1,6 %.

Сбраживание квасного сусла. С целью накопления ароматических, вкусовых веществ и диоксида углерода квасное сусло сбраживают молочнокислыми бактериями и дрожжами. Для получения кваса используют суспензии прессовых хлебопекарных дрожжей и молочнокислых бактерий. Расчет ведут исходя из концентрации суспензии микроорганизмов и расхода каждого из них согласно рецептуре.

Опыт 8.7. Определение расхода суспензии хлебопекарных дрожжей концентрацией 1 г на 100 см³ воды для приготовления 0,5 л кваса

Согласно рецептуре, расход дрожжей для сбраживания 1000 л кваса составляет 0,15 кг.

1. Расход дрожжей для сбраживания 0,5 л квасного сусла:

$$M_{\text{др}} = 0,5 \cdot 0,15 \cdot 1000 / 1000 = 0,075 \text{ г.}$$

2. Расход суспензии дрожжей:

$$V_{\text{др}} = 100 \cdot 0,075 / 1 = 7,5 \text{ см}^3.$$

После внесения микроорганизмов содержимое колб тщательно перемешивают, определяют начальное (перед брожением) содержание сухих веществ и переливают в стеклянные бутылки емкостью 1 л.

Бутылки закрывают марлей и ставят на брожение при температуре 18 – 20 °С на 4 суток, а затем укупоривают закручивающимися крышками и выдерживают в холодильнике при температуре 4 – 6 °С в течение 2–3 суток.

По истечении этого времени содержание сухих веществ сусла должно уменьшиться на 0,6 - 1,0 %, а кислотность должна достигнуть 2,0 - 2,5 к. ед. (кислотная единица, к. ед.: единица кислотности кваса, эквивалентная 1 см³ раствора гидроокиси натрия концентрацией 1 моль/дм³ на 100 см³ кваса).

Опыт 8.8. Определение массовой доли сухих веществ в молодом квасе

Ход работы.

Квас предварительно фильтруют через слой ваты, затем из него удаляют спирт. Для этого мерную колбу вместимостью 100 см³ заполняют квасом, при 20 °С доводят объем до метки. Содержимое колбы переносят в чашку для упаривания. Мерную колбу ополаскивают 10 - 15 см³ дистиллированной воды и промывные воды присоединяют к квасу.

Напиток упаривают до 1/3 первоначального объема. Остаток после упаривания количественно переносят в ту же мерную колбу и ее содержимое доводят дистиллированной водой до метки при 20 °С. В дальнейшем ход анализа аналогичен определению массовой доли сухих веществ в сусле.

Опыт 8.9. Определение общей кислотности кваса

Ход работы.

Из средней пробы напитка, освобожденного от диоксида углерода взбалтыванием, пипеткой отбирают 10 мл в коническую колбу, содержащую 50 – 100 см³ (в зависимости от интенсивности цвета напитка) дистиллированной воды. В раствор добавляют 4–5 капель 1 % раствора фенолфталеина и титруют раствором NaOH концентрацией 0,1 моль/дм³ до получения розового цвета, не исчезающего в течение 30 с.

Общую кислотность кваса K_k выражают в к. ед. и вычисляют по формуле:

$$K_k = V \cdot K,$$

где V – объем раствора NaOH концентрацией 0,1 моль/дм³ на 100 см³ кваса, израсходованного на титрование 10 мл кваса, мл; K – поправочный коэффициент.

Анализ готового кваса.

В готовом квасе определяют массовую долю сухих веществ, кислотность (по методикам, изложенным выше), содержание спирта, оценивают его органолептические показатели.

2.1. Определение органолептических показателей кваса

Температура кваса при определении его органолептических показателей должна составлять 12 °С. При этом необходимо оценить его внешний вид, цвет, вкус и аромат. Результаты органолептической оценки продукта следует представить в виде таблицы, форма которой приведена ниже.

Полученные результаты опытов по изучению показателей кваса необходимо занести в таблицу и сравнить их с требованиями стандарта.

Органолептические показатели кваса

Наименование кваса	Внешний вид	Цвет	Вкус	Аромат

Физико-химические показатели кваса

Наименование показателя	Норма		Опыт
	Хлебный квас	Окрошечный квас	
Массовая доля сухих веществ, %	5,4 – 5,8	3,0 – 3,2	
Массовая доля спирта, %	0,4 – 0,6	0,4 – 0,6	
Кислотность, °Т	2,0 – 4,0	2,0 – 4,0	

2.2. Определение содержания спирта в квасе

Метод оценки содержания спирта в квасе основан на отгонке спирта из навески кваса и определении относительной плотности дистиллята, доведенного дистиллированной водой до начальной массы.

Установка для отгонки спирта состоит из перегонной плоскодонной колбы

вместимостью 300–500 см³, холодильника, каплеуловителя и приемника для дистиллята – колбы на 250 см³. Приемную колбу погружают в чашку со льдом или охлажденной водой.

Ход работы. Квас, предназначенный для анализа, освобождают от диоксида углерода взбалтыванием.

Перед анализом колбу для перегонки и приемную колбу взвешивают с точностью до 0,1 г. В перегонную колбу отвешивают 100 г кваса, освобожденного от диоксида углерода. Напиток нейтрализуют 1 н раствором NaOH до нейтральной реакции по лакмусу. В приемную колбу наливают 10–15 см³ воды. Колбу для перегонки при помощи резиновой трубки через каплеуловитель соединяют с холодильником.

Квас медленно нагревают до кипения. Образовавшиеся пары (в том числе спирта) проходят через холодильник, охлаждаются, конденсируются и стекают в охлаждаемый приемник. Отгоняют не менее 2/3 объема жидкости, приемную колбу отделяют от холодильника, ополаскивают наконечник и доводят содержимое колбы дистиллированной водой до массы 100 г. Затем дистиллят перемешивают, определяют в нем пикнометром относительную плотность при 20 °C (d), рассчитывая ее по формуле:

$$d = (m_3 - m_1) / (m_2 - m_1),$$

где m_1 – масса пустого пикнометра, г; m_2 – масса пикнометра с водой, г; m_3 – масса пикнометра с дистиллятом, г.

Зная относительную плотность дистиллята, по таблице находят соответствующее ей содержание спирта в квасе.

Полученные результаты опытов по изучению физико-химических показателей кваса необходимо свести в таблицу и сравнить их с требованиями стандарта.

Контрольные вопросы:

1. Технология производства кваса.
2. Сбраживание квасного сусла.
3. Методы оценки готового кваса.

Раздел 3. Ферментные препараты, используемые в пищевой биотехнологии

Лабораторная работа № 9. Изучение стандартизации и способов стабилизации ферментных препаратов, применяемых в биотехнологических процессах

Цель работы: Изучение стандартизации ферментов, применяемых при переработке сельскохозяйственной продукции. Изучение способов иммобилизации, применяемых для стабилизации ферментных препаратов.

Теоретическое обоснование. Ферменты (от латинского слова fermentum - закваска) или энзимы (от греческого enzyme - в дрожжах) - это биологические катализаторы, лежащие в основе всех биохимических процессов в живой клетке. Они привлекают к себе все большее внимание, особенно в пищевой промышленности и медицине, для осуществления многих биотехнологических процессов.

К настоящему времени изучено свыше 2000 тысяч ферментов, и число их непрерывно возрастает. Согласно классификации Международного биохимического союза, их подразделяют на шесть классов:

1. Класс оксидоредуктаз включает ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции. Субстрат, подвергающийся окислению, рассматривается как донор водорода. Класс насчитывает 17 подклассов в зависимости от природы той группы в молекуле субстрата, которая подвергается окислению (спиртовая, альдегидная, кетонная и т. д.).

2. Класс трансфераз объединяет ферменты, катализирующие реакции переноса групп (метильных, гликозильных, аминных и др.) от одного соединения к другому (акцептору). Класс подразделяется на 8 подклассов в зависимости от природы переносимых групп.

3. К классу гидролаз принадлежат ферменты, катализирующие гидролитическое расщепление различных соединений; он разделяется на 11 подклассов в зависимости от типа гидролизуемой связи - сложноэфирной, пептидной, гликозидной и т. д.

4. Класс лиаз - ферменты, отщепляющие от субстрата ту или иную группу негидролитическим путем с образованием двойных связей, или наоборот, присоединяющие группы к двойным связям. Включает 6 подклассов в зависимости от типа подвергающейся разрыву связи (углерод-углерод, углерод-кислород и т. п.)

5. К классу изомераз относят ферменты, катализирующие реакции изомеризации, т.е. структурные или геометрические изменения в пределах одной молекулы. Этот класс разделяется на 5 подклассов в зависимости от типа

катализируемой реакции.

6. Класс лигаз (или синтетаз) объединяет ферменты, которые катализируют соединение двух молекул друг с другом, сопряженное с гидролизом пирофосфатной связи в молекуле аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) или аналогичного трифосфата. Лигаза разделяются на 5 подклассов по типу образуемой связи.

Комиссия по ферментам Международного биохимического союза разработала правила рациональной номенклатуры ферментов. Согласно этим правилам, в названии фермента указываются его субстраты и основной класс, к которому принадлежит фермент. Каждый фермент обозначается специальным четырехзначным шифром, указывающим номер класса, подкласса, подподкласса и номер фермента в подподклассе. Например, 3.2.1.1. - α 1,4-глюканглюконогидролаза; 4.1.1.1. - карбоксилиаза -2- оксокислота.

Систематическое название без дополнительных объяснений позволяет представить реакцию, катализируемую данным ферментом. Однако, оно довольно длинно, поэтому наряду с систематическими используют и тривиальные (рабочие) названия ферментов. Обычно тривиальные названия ферментов строятся по названию соответствующих субстратов с добавлением суффикса «аза». Так, рабочие названия представленных выше ферментов, соответственно, α -амилаза и пируватдекарбоксилаза.

Из более чем 2000 известных на сегодня ферментов в промышленном масштабе производится менее 50. Ферменты, используемые в различных биотехнологических процессах переработки сельскохозяйственной продукции, получают из тканей и органов животных, растений или путем микробиологического синтеза. Последний способ получил наибольшее распространение для промышленного производства ферментов. Наибольшее применение при переработке сельскохозяйственной продукции нашли ферментные препараты класса гидролаз.

Использование ферментов в различных отраслях биотехнологии ограничено их высокой стоимостью и во многих случаях недостаточной стабильностью. Способы стабилизации промышленных препаратов ферментов основаны на методах иммобилизации.

Иммобилизация – это ограничение подвижности молекул ферментов, их конформационных перестроек. Она основана на физико-химических принципах, позволяющих закрепить структуру ферментов таким образом, чтобы активный центр его молекулы сохранял каталитическую активность в течение длительного времени, допускающего повторное использование ферментных препаратов.

Изучение стандартизации ферментных препаратов.

Ход работы.

Задание 1. Пользуясь классификатором ферментов, разработанным Международным биохимическим союзом, и лекционным материалом, описать наиболее важные промышленные ферменты, используемые в различных отраслях переработки сельскохозяйственной продукции в форме таблицы (не менее 15 ферментов). Ферменты в таблице расположить по классам.

Наиболее важные ферменты, используемые при переработке сельскохозяйственной продукции

Шифр	Систематическое название	Тривиальное название	Катализируемая реакция	Применение в пищевой промышленности
1.11.1.6 и т.д.	$\text{H}_2\text{O}_2 : \text{H}_2\text{O}_2$ -оксидоредуктаза	Каталаза	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	При дезинфекции молока перекисью водорода

Задание 2. Пользуясь лекционным материалом, описать в форме таблицы способы иммобилизации, применяемые для стабилизации ферментных препаратов.

Способы иммобилизации ферментных препаратов

Наименование	Используемые носители	Преимущества и недостатки способа	Примеры ферментов, иммобилизованных данным способом

Контрольные вопросы:

1. Какую роль выполняют ферментные препараты при переработке сельскохозяйственной продукции?
2. Классификация ферментов.
3. Какие классы ферментов наиболее часто применяются при переработке сельскохозяйственной продукции?
4. Что такое иммобилизация ферментов и для каких целей она применяется?
5. Способы иммобилизации ферментных препаратов.

Лабораторная работа № 10. Определение амилолитической активности ферментных препаратов различного происхождения

Цель работы: Изучить амилолитическую активность ферментных препаратов различного происхождения.

Задачи: - изучить препараты амилолитических ферментов, применяемых в бродильных производствах.

Теоретическое обоснование. Амилолитическая активность характеризует способность ферментов катализировать расщепление крахмала.

Крахмал как основной компонент сухих веществ сырья, применяемого в бродильных производствах (клубни картофеля, зерно злаковых культур), непосредственно дрожжами не сбраживается. Поэтому его необходимо гидролизовать до сбраживаемых сахаров, для чего требуется применять ферменты.

В пивоваренном и спиртовом производствах издавна применяли зерновой солод как источник амилолитических ферментов. Солод представляет собой проросшее и осторожно высушенное зерно злаковых культур. В зерне злаков содержатся два вида амилаз, различающихся по характеру действия на крахмал: α -амилаза, называемая ещё декстриногенамилазой, и β -амилаза или сахарогенамилаза. Обе амилазы расщепляют в крахмале связь 1,4, но α -амилаза обладает более мощным действием. При действии на крахмал она быстро дробит молекулы амилозы и амилопектина на крупные декстрины, которые затем расщепляет до мальтозы. β -амилаза действует иначе: последовательно отщепляет от конца цепи полисахарида одну за другой молекулы мальтозы. При этом действие β -амилазы заканчивается у разветвления цепи амилопектина, а α -амилаза расщепляет амилопектин не только до мест разветвления цепи, но и между ними. В не проросшем зерне большинства злаков содержится только β -амилаза; α -амилазы там нет, но она активно образуется при прорастании. Таким образом, применяемый в бродильных производствах зерновой солод в основном является источником активной α -амилазы, выполняющей задачу гидролиза крахмала. Однако, эффективность солода как осахаривающего агента достаточно низка, по сравнению с амилолитическими препаратами микробного происхождения. Кроме того, зерновой солод помимо амилолитических содержит целый ряд других гидролитических ферментов, способствующих накоплению нежелательных веществ во время брожения (пептидов, аминокислот и др.). Таким образом, для бродильного производства, перерабатывающего крахмалосодержащее сырье, представляет интерес применение ферментов микробного происхождения, обладающих высокой осахаривающей способностью и лишенных других ферментов. Высокая активность препаратов микробного происхождения объясняется тем, что помимо α -амилазы они содержат еще один вид амилолитических ферментов – глюкоамилазу, расщепляющую крахмал, декстрины и мальтозу до глюкозы.

Все ферментные препараты, применяемые в спиртовом производствах, представляют собой либо нативные неочищенные глубинные или высушенные

поверхностные культуры микроорганизмов, либо неочищенные концентрированные препараты, и как правило являются комплексными, т.е. содержат больше одного фермента. Характеристика основных ферментных препаратов, применяемых в спиртовой промышленности приведена в таблице 16.

Таблица 16

Характеристика амилолитических препаратов микробного происхождения

Наименование	Характеристика препарата	Продуцент и способ культивирования	Присутствующие ферменты
Амилоризин Пх	Сухая культура, 90 % сух. в.	<i>Asp. oryzae</i> 476- И, поверхностный	α-амилаза, протеаза
Глюкаваморин Гх	Сиропобразный препарат, 45-50 % сух. в.	<i>Asp. awamori</i> , шт.673, поверхностный	α-амилаза, глюкоамилаза, трансглюкозилаза, гемицеллюлаза, протеаза
Глюкобататин Гх	Жидкая культура, 3-4 % сух. в.	<i>Asp. batatae</i> -61, глубинный	α-амилаза, глюкоамилаза
Амилодиастатин Гх	Жидкая культура, 2 % сух. в.	<i>Bac. diastaticus</i> , глубинный	α-амилаза
Амилосубтилин ГЗх	Порошок, 90 % сух. в.	<i>Bac. subtilis</i> , глубинный	α-амилаза
Комплексный препарат «Биоджест» английской фирмы «BioconLimited»	Порошок, 90 % сух. в.	Нет сведений	Нет сведений

Ферментную активность препарата выражают в произвольно выбранных единицах, определяемых количеством превращенного субстрата за единицу времени при оптимальных условиях для действия фермента. Долгое время в спиртовой промышленности нашей страны основным методом определения активности амилолитических препаратов было определение амилолитической способности (АС). Метод разработан во ВНИИ спиртовой промышленности Климовским и Родзевич и основан на гидролизе крахмала препаратом фермента до неокрашиваемых йодом декстринов. Одна единица АС соответствует такому количеству фермента, которое способно катализировать гидролиз 1 г растворимого крахмала до продуктов, не дающих окраски с йодом, за 1 час при температуре 30 °С. Величина АС рассчитывается по формуле:

$$AC = 0,25 \cdot 60 / (m_{\phi} t),$$

где 0,25- количество крахмала, которое находится в 25 см³ его 1 % раствора, г;

m_φ – масса навески ферментного препарата, взятого на анализ, г;

t – время полного расщепления крахмала до продуктов, не окрашиваемых йодом, мин.

В настоящее время разработаны более точные методы оценки активности амилолитических ферментов, в частности колориметрический метод определения декстриногенной активности (метод ВНИИПрБ).

За единицу декстриногенной активности (ДАк) принимают такое количество

фермента, которое катализирует гидролиз 1 г крахмала до декстринов за 60 мин при температуре 30 °С и рН среды 4,8-4,9 (для солодовых препаратов), 4,7 (для мицелиальных препаратов) и 6,0 (для бактериальных препаратов). Количество прогидролизованного крахмала устанавливают фотоколориметрически по йодной пробе.

Этот метод дает воспроизводимые результаты, по точности превосходит визуальный метод Климовского и Родзевич, позволяет определять декстриногенную активность ферментных препаратов различной степени очистки, полученных с применением таких продуцентов, как микромицеты и бактерии, а также солод различных зерновых культур. Он широко используется для анализа сусла и бражки на спиртовых заводах, для анализа полупродуктов ферментных заводов.

Материалы и оборудование:

1. Солодовые экстракты различных злаковых культур: 5 г свежепросоженного солода растереть в ступке пестиком, перенести без потерь в коническую колбу на 200 см³, добавить 90 см³ дистиллированной воды и 10 мл фосфатного буфера с рН 4,8. выдержать при температуре 30 °С не менее 1 час при периодическом помешивании стеклянной палочкой. Хранить в холодильнике. В 5 см³ такого раствора содержится 250 мг фермента.

2. Растворы ферментных препаратов микробного происхождения. 0,1 г ферментного препарата помещают в мерную колбу на 100 см³ и доводят до метки дистиллированной водой. Раствор хранят до 24 час при температуре от 2 до минус 4 °С. В связи с высокой активностью ферментных препаратов, перед проведением анализа готовят рабочий раствор ферментного препарата, разбавляя основной раствор в 10 - 20 раз. В 5 см³ рабочего раствора ферментного препарата при этом будет содержаться, соответственно 0,5 и 0,25 мг фермента.

1 % раствор крахмала: К 10 г крахмала добавить 250 см³ холодной дистиллированной воды, перемешать, добавить еще 250 см³ горячей воды (t=50-60 °С) и поместить на водяную баню на 20 мин, непрерывно помешивая. Охладить, перелить в мерную колбу на 1 л через слой ваты, добавить 100 см³ фосфатного буфера (рН 4,8) и довести дистиллированной водой до метки.

0,1 н. раствор HCl: 8,2 мл концентрированной соляной кислоты развести в мерной колбе на 1 л дистиллированной водой до метки (кислоту лить в воду!).

0,25 % раствор йода в KI: 0,25 г кристаллического йода и 2,5 г йодистого калия поместить в мерную колбу на 100 см³, развести в небольшом количестве дистиллированной воды (около 40 см³) и довести водой до метки. Хранить в темноте. Из него готовить рабочий раствор йода в соляной кислоте: 10 см³ основного раствора в мерной колбе на 500 см³ довести до метки 0,1 н. раствором соляной кислоты. При этом определяют оптическую плотность рабочего раствора на ФЭК-56 М при длине волны 453 нм (фильтр № 4) в кювете с длиной рабочей грани 1 см: она должна быть 0,220 ± 0,01.

Фосфатный буферный раствор с pH 4,7 - 4,9: 5,938 г Na_2HPO_4 развести дистиллированной водой мерной колбе на 500 см³ до метки (раствор 1). 4,540 г KH_2PO_4 аналогично развести в мерной колбе на 500 см³ (раствор 2). Для получения буферного раствора с pH 4,85 перед анализом растворы 1 и 2 смешивают в соотношении 1:1.

Стаканы на 50 см³; цилиндры мерные на 50 см³, на 100 см³; пипетки на 5 см³; на 2 см³; колбы конические на 100 см³; таз пластмассовый с водой температурой 30 °С; фотоэлектроколориметр КФК-3.

Опыт 10.1. Изучение препаратов амилолитических ферментов, применяемых в бродильных производствах

Изучить теоретические положения и заполнить таблицу.

Таблица

Препараты амилолитических ферментов, применяемых в бродильных производствах

Наименование препарата	Характеристика препарата	Источник и способ получения	Какие амилолитические ферменты содержит	Характер действия на крахмал

Опыт 10.2. Определение декстриногенной активности ферментов фотоколориметрическим методом

Ход работы:

1) В стеклянный стакан объемом 50 см³ налить 10 см³ раствора крахмала и поместить в водяную баню при температуре 30 °С на 10 мин.

2) Не вынимая стакана, добавить пипеткой 5 см³ рабочего раствора фермента. Одновременно выполняется контрольный опыт (один на всю подгруппу). В контрольную пробу добавить вместо фермента 5 см³ дистиллированной воды. Смеси быстро перемешать и выдержать при 30 °С в течение 10 мин.

3) В коническую колбу на 100 см³ добавить 25 мл рабочего раствора йода, приготовленного на соляной кислоте.

4) Спустя 10 мин стаканы вынуть из бани, отобрать пипеткой 0,25 см³ прогидролизованного раствора и добавить в колбу с йодом. Быстро перемешать. Соляная кислота сразу прерывает действие ферментов. Полученные растворы приобретают различную окраску: контрольный имеет синий цвет, а опытный – фиолетовый различной степени интенсивности в зависимости от степени прогидролизованного крахмала.

5) Определить оптическую плотность опытного и контрольного растворов по

отношению к дистиллированной воде. Для работы используют кюветы с длиной рабочей грани 1 см и красный светофильтр (№ 8). значение оптической плотности контрольного раствора (D_1) должно быть не менее 0,690.

Полученные данные занести в таблицу (для всех ферментных препаратов).

Таблица

Декстриногенная активность ферментов различного происхождения

№ п/п	Ферментный препарат	Масса фермента, участвующего в реакции, мг (m_f)	Оптическая плотность опытного раствора, (D_1)	Оптическая плотность контрольного раствора (D_1)	Количество прогидролизованного крахмала (C)	Декстриногенная активность фермента (ДАк), ед./г

Обработка результатов.

Количество прогидролизованного крахмала C (в г) вычисляют по формуле:

$$C = 0,1 (D_1 - D_2) : D_1,$$

где 0,1 - количество крахмала, введенного в реакцию; D_1 и D_2 , соответственно, оптическая плотность контрольного и опытного растворов. C не должно быть меньше 0,02 или больше 0,07 г.

Активность фермента (ед./г) вычисляют по формулам 2-4, в зависимости от происхождения ферментного препарата:

для свежепоросшего солода: $ДАк = (6,889C - 0,029388)1000 : m_f$.

для мицелиальных препаратов: $ДАк = (7,264C - 0,03766)1000 : m_f$

для бактериальных препаратов: $ДАк = (5,885C - 0,001671)1000 : m_f$,

где m_f – масса ферментного препарата, введенного в реакцию; C - количество прогидролизованного крахмала, г

Сравните активность ферментных препаратов различного происхождения и сделайте вывод.

Контрольные вопросы:

1. Амилолитические ферменты и их действие на крахмал.
2. Для чего применяют ферментные препараты в бродильных производствах?
3. Какие ферментные препараты применяются в бродильных производствах и что они из себя представляют?
4. Что такое амилолитическая активность ферментов и в чем ее выражают?
5. Какие методы существуют для определения амилолитической активности ферментов?
6. Дайте определение активности амилолитических ферментных препаратов. При каких условиях проводится ее определение?
7. В чем заключается различие между термофильными и мезофильными α -

амилазами?

Лабораторная работа № 11. Изучение цитолитических и протеолитических ферментных препаратов и методов определения их активности

Цель работы: Изучить действие цитолитических и протеолитических ферментных препаратов и методы определения их активности.

Задачи:

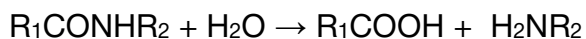
- изучить препараты, применяемые в промышленности;
- определить сычужную активность ферментных препаратов.

Теоретическое обоснование: При переработке в пивоваренной промышленности значительного количества несоложенного сырья и плохо разрыхленного солода используют промышленный препарат цитолитического действия *цитороземин*, продуцентом которого является гриб *Trichothecium roseum* и другие грибы. Комплекс ферментов, синтезируемый этим грибом при поверхностном культивировании, обладает в основном ферментами, действующими на гемицеллюлозы и пентозаны - основные вещества клеточных стенок ячменя. Клеточные стенки ячменя на 80 - 90 % состоят из гемицеллюлозы различного строения. Применение цитороземина позволяет увеличить выход пива за счет гидролиза неэкстрактивных веществ клеточных стенок ячменя.

Цитолитическая активность (ЦАк) дает суммарное представление о действии гемицеллюлаз на вещества клеточных стенок. Субстратом при определении ЦАк служат клеточные стенки ячменя, освобожденные от крахмала, сахаров и белков. Определение общей цитолитической активности проводят в течение 2 час при 40 °С и рН 4,6. За единицу цитолитической активности принимают такое количество фермента, которое при действии в указанных условиях катализирует образование из 5 г субстрата 10 мг ксилозы.

Определение ЦАк выполняется в три этапа: приготовление субстрата, приготовление ферментной вытяжки, ферментативный гидролиз субстрата вытяжкой цитолитических ферментов с последующим определением редуцирующих сахаров методом Бертрана. В зависимости от расхода перманганата калия на определение редуцирующих сахаров находят цитолитическую активность цитороземина.

При переработке высокобелкового сырья (мяса, рыбы), а также для осветления таких продуктов, как пиво, вино, сок, часто применяют протеолитические ферменты. *Протеолитические ферменты* (протеазы) принадлежат к пептидгидролазам и катализируют реакции расщепления белков и пептидов путем разрыва пептидной связи по схеме:



Протеолитическая активность характеризует способность ферментов гидролизовать белок до пептидов и аминокислот и выражается числом единиц активности протеазы в 1 г ферментного препарата.

Протеолитическая активность (Пак) определяется по скорости ферментативного гидролиза белка, в качестве которого используют чаще всего казеинат натрия. Определение протеолитической активности Пак микробных препаратов проводят в соответствии с ГОСТ 20264-70 модифицированным методом Ансона. Метод основан на гидролизе белка казеината натрия ферментами исследуемого препарата с последующим колориметрическим определением продуктов гидролиза после осаждения негидролизованного белка и высокомолекулярных соединений трихлоруксусной кислотой (ТХУ).

За единицу протеолитической активности Пак принимают такое количество фермента, которое за 1 мин при 30 °С превращает в неосаждаемое ТХУ состояние казеинат натрия в количестве, соответствующем 1 мкмоль тирозина (0,181 мг). Активность выражают в международных единицах.

При производстве сыра для створаживания молока применяют протеолитический фермент *ренин*, получаемый из желудка телят (сычуг) или микробным синтезом из плесневого гриба *Mukormiehei*. При использовании этих ферментных препаратов возникает необходимость определять сычужную активность фермента.

Сычужная активность (СС) характеризует способность ферментов катализировать реакцию свертывания молока. Сычужную активность препаратов определяют по времени, протекающему с момента внесения ферментного препарата в молоко до появления творожистого осадка при 40 °С.

За единицу сычужной активности принимается такое количество фермента, которое катализирует расщепление 1 г субстрата за 1 час в условиях температуры и pH среды, наиболее приемлемых для образования творожного сгустка. Наилучшие условия проведения ферментативной реакции достигаются при следующем соотношении: количество субстрата в реакционной смеси – 2 части, а исследуемого ферментного раствора – 1 часть.

Материалы и оборудование: 1) растворы ферментных препаратов (ФП) животного или микробного происхождения: 0,1 г ферментного препарата помещают в мерную колбу на 100 см³ и доводят до метки дистиллированной водой. Раствор хранят до 24 час при температуре от 2 до минус 4 °С. В связи с высокой активностью ферментных препаратов микробного происхождения, перед проведением анализа готовят рабочий раствор ФП, разбавляя основной раствор в 10 - 20 раз. В 5 см³ рабочего раствора ФП при этом будет содержаться, соответственно, 0,5 и 0,25 мг фермента; 2) молоко; 3) баня водяная; 4) стаканы стеклянные объемом 50 см³; 5) термометр; 6) цилиндры мерные на 50 см³.

Опыт 11.1. Изучение действия цитолитических и протеолитических ферментных препаратов, применяемых в пищевой промышленности

Ход работы. Пользуясь теоретическими положениями, заполнить таблицу.

Таблица

Характеристика цитолитических и протеолитических ферментных препаратов

Наименование препарата	Источник и способ получения	Какие ферменты содержит, к какому классу относится	Основной субстрат, на который действует	Применение в промышленности

Определение сычужной активности ферментных препаратов

Ход работы. В стеклянный стакан на 50 см³ цилиндром влить 20 см³ молока. Добавить 10 см³ раствора фермента. Стакан поместить в водяную баню температурой 40 °С. Засечь время до появления творожного сгустка в реакционной смеси. За время наблюдений строго следить за температурой в водяной бане.

Данные наблюдений занести в таблицу.

Таблица

Определение сычужной активности ферментного препарата

Препарат	Масса молока, г	Масса фермента, участвующего в реакции, мг	Время до створаживания молока, мин	Сычужная активность, ед

Обработка результатов. Величина сычужной активности рассчитывается по формуле:

$$CC = M \cdot 60 / m_{\Phi} t,$$

где M – масса молока, г; m_{Φ} – масса фермента, участвующего в реакции, мг;
 t – время до створаживания молока, мин.

Контрольные вопросы:

1. Цитолитические ферменты и их действие на сырье. В каких производствах их применяют?
2. Что такое цитолитическая активность и как её определяют?
3. Протеолитические ферменты и их действие на сырье. В каких производствах их применяют? Приведите примеры протеолитических ферментных препаратов.
4. Протеолитическая активность и методы её определения.

Лабораторная работа № 12. Определение активности каталазы по Баху

Цель работы. ознакомиться с ферментом оксидоредуктазой и ее каталитическом действии на разложение пероксида водорода.

Задачи:

- провести разложение пероксида водорода каталазой и рассчитать ее каталитическую активность.
- провести качественный анализ на выделение кислорода при разложении данного субстрата.
- фотометрически определить каталазу в биологических объектах.

Теоретическое обоснование. Оксидоредуктазы - класс ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные реакции. Окисление мономеров, образующихся в процессе катаболизма полимеров, представляет собой сложный многоступенчатый процесс. Окисление веществ в клетках протекает, в основном, путем отщепления водорода (дегидрированием) или отщеплением электронов, или путем присоединения кислорода к молекуле окисляемого соединения.

Акцепторами водорода у дегидрогеназ является НАД⁺, НАДФ, ФАД (флавинадениндинуклеотид) и ФМН (флавиномононуклеотид), у некоторых флавиновых - кислород (их называют оксидазами), у гемсодержащих (пероксидаз и каталаз) - H₂O₂ (пероксид водорода). Акцепторами и переносчиками электронов являются цитохромы, содержащие гем (гемопротейны). Каталаза относится к гемопротейнам, катализирует процесс разрушения ядовитого для клеток пероксида водорода на воду и кислород: $2\text{H}_2\text{O}_2 = 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$.

Для живой клетки пероксид водорода является сильным ядом, поэтому все ферменты, образующие и обезвреживающие H₂O₂, находятся в пероксисомах - органеллах, покрытых мембраной. Главными потребителями H₂O₂ являются пероксидазы, которые окисляют фенолы, амины, некоторые гетероциклические соединения и другие субстраты дегидрированием, переносят снятые с субстратов [2H] на H₂O₂, восстанавливая его до 2H₂O. Молекулы пероксида водорода, невостребованные пероксидазами, обезвреживаются каталазой.

Метод определения активности каталазы основан на определении количества пероксида водорода, расщепленного в процессе инкубации с ферментом. Количество H₂O₂ в реакционной смеси определяют титрованием в кислой среде раствором с концентрацией перманганата калия 0,02 моль/л:



На основании приведенного уравнения реакции можно рассчитать, что 1 мл раствора с концентрацией перманганата калия 0,02 моль/л соответствует 1,7 мг (50 мкмоль) пероксида водорода.

Опыт 12.1. Количественное определение активности каталазы

2-3 г сырого картофеля (или другого свежего растительного материала) тщательно растирают в ступке с кварцевым песком или стеклом. Для уменьшения кислой реакции добавляют на кончике скальпеля CaCO_3 до прекращения выделения пузырьков CO_2 . В процессе растирания в ступку добавляют небольшими порциями 40-50 мл воды. Растертую массу количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят водой до метки и перемешивают. Смесь оставляют стоять 10-15 мин и после перемешивания фильтруют.

Берут две конические колбочки вместимостью 150-200 мл и вносят в них по 20 мл полученного фильтрата. Содержимое одной колбы кипятят в течение 1 мин и охлаждают до комнатной температуры (контроль). Другая колба - опытная, содержит активный фермент. К содержимому опытной и контрольной колб приливают по 20 мл воды и по 3 мл раствора с массовой долей H_2O_2 1 %. Содержимое тщательно перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 30 мин. По окончании инкубации в обе колбы добавляют по 5 мл раствора с массовой долей серной кислоты 10 %, перемешивают и избыток H_2O_2 в каждой колбе оттитровывают раствором с концентрацией перманганата калия 0,02 моль/л до образования розового окрашивания, не исчезающего в течение 1 мин.

Активность каталазы выражают в мкмоль пероксида водорода, расщепившегося под действием фермента в расчете на 1 г исследуемого материала (или на 1 мг вытяжки из него) за 1 мин. За ферментативную единицу (Е) принимают количество фермента, необходимого для превращения 1 мкмоль субстрата в 1 минуту при 25 °С.

Вычисление ведут по формуле:

$$X = \frac{(a - b)T \cdot 50 \cdot 100}{m \cdot 20 \cdot 30},$$

где X - активность каталазы, Е/г; $(a - b)$ - разность между объемами раствора с концентрацией перманганата калия 0,02 моль/л, пошедшего на титрование контрольной (a), и опытной (b) проб, мл; T - титр примененного для титрования раствора перманганата калия; 50 - коэффициент пересчета на мкмоль H_2O_2 ; 100 - общий объем приготовленного экстракта; m - масса взятого для анализа материала, г; 20 - объем фильтрата, взятого для анализа, мл; 30 - время инкубации, мин.

Принцип определения, порядок анализа и результат анализа записывают.

Активность каталазы можно определить и по объему кислорода, выделившегося после прибавления к исследуемому объекту H_2O_2 . Этот принцип используют для определения активности каталазы в молоке, выражаемую каталазным числом, представляющим собой объем кислорода (мл) выделившийся за 2 часа при 25 °С из добавленных к 15 мл молока 5 мг раствора с массовой долей H_2O_2 1 %. Молоко, полученное от здоровых животных, выделяет 0,7- 2,5 мл кислорода, т. е. каталазное число натурального молока составляет не более 2,5. Молоко, полученное от больных животных (мастит и др.), и молозиво имеют повышенные каталазные числа, достигающие до 15.

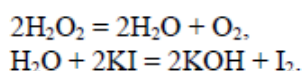
Опыт 12.2. Определение активности каталазы экспресс-методом

В две пробирки наливают по 5 мл вытяжки из клубней картофеля, в третью 5 мл воды. В одной пробирке вытяжку кипятят и охлаждают до комнатной температуры под струей воды. Затем в каждую пробирку добавляют по 2 мл 3 % раствора пероксида водорода. Под действием каталазы пероксид водорода разлагается, выделяющийся кислород вспенивает жидкость. По количеству образующейся в пробирке пены можно судить об активности фермента. Отсутствие пены указывает на инактивирование или отсутствие каталазы.

Опыт 12.3. Фотометрическое определение каталазы в биологических объектах

Цель достигается тем, что в способе определения активности каталазы в биологических объектах путем окрашивания пробы раствором, содержащим йодистый калий, с последующим анализом, пробу биологического материала обрабатывают перекисью водорода и смесью ацетона и йодистого калия в отношении 1:1, причем анализ проводят путем фотоколориметрирования пробы на ФЭК-56 М при длине волны 435-445 нм, а активность каталазы определяют по формуле: $A = D \cdot 0,02$, где A - активность каталазы в пробе; D - оптическая плотность исследуемой пробы; 0,02 - коэффициент перевода в условные единицы активности (Е).

Опыт основан на взаимодействии перекиси водорода с йодистым калием по уравнениям:



В предлагаемом способе упрощение определения активности достигается за счет отсутствия, во-первых, субъективизма в оценке результатов анализа, во-вторых, необходимости в ежедневном титровании перекиси водорода и, в-третьих, исключения раствора перманганата калия, для установления титра которого необходимо 5-6 дней.

Предлагаемый способ осуществляют следующим образом. Готовят 3 % раствор йодистого калия в 50 % ацетоне. Для этого 50 мл 3 % раствора йодистого калия растворяют в 50 мл ацетона, т. е. в отношении 1:1. Берут навеску 0,1 г исследуемой пробы и растирают в ступке со стеклянным порошком. Для уменьшения кислотности к растертой пробе добавляют на кончике шпателя CaCO_3 , после чего приливают 10 мл 3 % перекиси водорода и 10 мл 3 % раствора йодистого калия в 50 % ацетоне. Смесь фильтруют, центрифугируют и фотоколориметрируют на ФЭК-56М на синем светофильтре с длиной волны 435-445 нм в кювете 10 мм. Активность каталазы определяют по формуле:

$$A = D \cdot 0,02,$$

где A - активность каталазы в пробе; D - оптическая плотность исследуемой пробы; 0,02 - коэффициент перевода в условные единицы каталазы (Е).

В приложении 3 приведены данные по активности каталазы в картофеле, яблоках, люцерне, саксауле, терескене и полыни, определенные базовым и

предлагаемым способами. Результаты таблицы показывают, что величина ошибки лежит в пределах 3-4 % в среднем.

В приложении 4 представлены данные о соответствии величины оптической плотности и активности каталазы. По таблице, не проводя математических расчетов, можно определять активность каталазы, зная оптическую плотность раствора. Для картофеля мы получили оптическую плотность 0,6, после расчета получаем 30,1. Если найти в таблице данную оптическую плотность, то ей соответствует активность каталазы, равная 30 Е.

При лабораторных испытаниях способа установлено, что он позволяет упростить определение активности каталазы за счет исключения операции титрования и повысить точность на 5-10 %, а также снизить время определения с 1,5 ч до 30 мин, повышая при этом производительность труда в 2-3 раза.

Контрольные вопросы:

1. Основные пути окисления субстратов в клетке.
2. Характеристика строения и действия НАД⁺- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ.
3. Какие ферменты называют оксидазами? Их кофакторы?
4. Химизм, образование и пути обезвреживания пероксида водорода в клетках.
5. Какие оксидоредуктазы участвовали в процессе спиртового брожения?
6. В чем заключается роль кофермента?

Лабораторная работа № 13. Определение активности липазы

Цель работы: Изучить действие липаз и методы определения их активности

Задачи: - изучить теоретический материал работы;

- провести исследование действия липаз в пищевой промышленности.

Теоретическое обоснование. В пищевой промышленности липазы используются в следующих целях:

- в молочной промышленности – для улучшения аромата, ускорения созревания сыра, модификации сливочного масла;
- в кондитерской, мясной и рыбной промышленности – для улучшения аромата;
- в масложировой промышленности – для получения переэтерифицированных жиров, в процессах гидролиза.

Одним из наиболее частых направлений использования липаз в пищевой промышленности является изменение вкуса и аромата пищевых продуктов за счет гидролиза их жировых компонентов. Изменение вкуса и аромата в данном случае достигается за счет образования жирных кислот с числом атомов углерода от четырех до десяти, обладающих выраженным вкусом и ароматом. Модифицировать вкус и

аромат продуктов можно, непосредственно добавляя липазы в пищевые продукты либо получая ароматизаторы с использованием липаз.

Липазы являются растворимыми в воде ферментами, которые катализируют гидролиз триглицеридов до ди- и моноглицеридов, жирных кислот и глицерина (рис. 19).

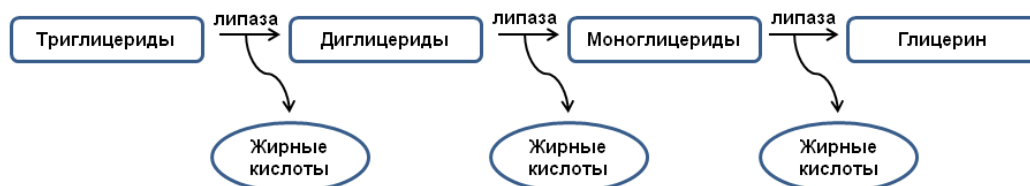


Рисунок 19. Гидролиз жиров в присутствии липазы

Следует отличать их от эстераз, которые гидролизуют субстраты с ацильной цепью, включающей менее десяти атомов углерода. Кроме того, липазы действуют на границе раздела водной и неводной фаз, тогда как эстеразы – только в водной фазе.

Активность липаз зависит от pH. Обычно липазы стабильны в слабокислых и нейтральных средах (pH 4,0...8,0). Большинство липаз проявляет максимальную активность при температуре 30...35 °C, термофильные липазы действуют при 40...60 °C.

Несмотря на то, что липазы не имеют кофакторов, ионы кальция способны повышать их активность. Ингибиторами липаз являются Co^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , Sn^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} .

Липазы можно разделить на две группы в зависимости от региоселективности. Региоселективность - явление, при котором в химической реакции один путь разрыва и образования связей преобладает над остальными возможными путями. В зависимости от степени региоселективности реакции могут быть частично или полностью региоселективными. Липазы первой группы не проявляют региоселективности к субстратам и гидролизуют все три сложноэфирные связи в триглицеридах. Липазы второй группы действуют на первую и третью связи в триглицеридах и приводят к образованию свободных жирных кислот и 1,2-(2,3)-диглицеридов и 2-моноглицеридов. Длительная выдержка 1,3-специфичных липаз с триглицеридами приводит к их переходу в смесь глицерина с жирными кислотами. Это связано с тем, что 2-моноглицериды и 1,2-диглицериды способны изомеризоваться в 1-моноглицериды и 1,3-диглицериды, соответственно. Кроме того, известны липазы, способные по-разному действовать на глицериды, содержащие насыщенные и ненасыщенные жирнокислотные остатки. Основными источниками получения промышленных липаз являются бактерии и грибы, причем использование грибных источников является более предпочтительным, поскольку в этом случае липазы выделяются внешне из клетки. Наиболее важными продуцентами липаз являются *Pseudomonas sp.*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium camembertii*, *Bacillus subtilis*.

Активность препаратов липаз определяется согласно методике, приведенной в ГОСТ ISO 13082-2014.

Международная единица активности липазы - это активность липазы, в результате действия которой выделяется масляная кислота из глицерилтрибутирата со скоростью 1,25 мкмоль/мин при заданных условиях.

Свойства некоторых липаз микробного и животного происхождения приведены в таблице 17.

Таблица 17

Свойства липаз микробного и животного происхождения

Продуцент	Оптимум pH	Температурный оптимум, °C	Специфичность
<i>Asp. niger</i>	5...7	30...40	1,3
<i>Asp. oryzae</i>	5,5...7,0	30...40	1,3
<i>B. subtilis</i>	8...10	30...40	1,3
<i>Candida cylindracea</i>	5...8	30...50	1,2,3
<i>Geotricum candidum</i>	5...8	40...50	1,2,3
<i>Penicillium cyclopium</i>	4,5...7,5	30...50	1,3
Свиная поджелудочная липаза	7,3...9,0	35...45	1,3
Лингвальная липаза ягненка	5...6	30...45	1,3

Активность липазы выражают в международных единицах липазы Е на 1 г или на 1 мл продукта. Метод определения активности липаз основан на нейтрализации раствором гидроксида натрия с помощью рН-метра свободных жирных кислот, например, масляной кислоты, после гидролиза триглицеридов. Расчет активности липазы в единицах Е на 1 мл или на 1 г основан на учете количества гидроксида натрия, израсходованного за заданный период времени. При этом не учитывается ошибка, связанная с невозможностью титрования малых концентраций масляной кислоты (4 %), не подверженной диссоциации.

Опыт 13.1. Определение активности липазы

Материалы и оборудование.

Раствор гидроксида натрия ([NaOH] = 0,025 моль/л). При помощи пипетки добавляют 25 мл раствора гидроксида натрия молярной концентрации 1 моль/л с точно известным титром в колбу объемом 1000 мл, доводят водой до метки и тщательно перемешивают. Раствор NaOH молярной концентрации 0,025 моль/л хранят в закрытой емкости при комнатной температуре не больше одного месяца. При анализе проб малоактивных липаз и титровании используют раствор NaOH молярной концентрации 0,010 моль/л, который готовят непосредственно перед использованием.

Раствор лецитина (10 % раствор). В емкость вместимостью 100 мл помещают 10,0 г лецитина и растворяют его в 95 мл жидкого парафина при перемешивании с помощью магнитной мешалки в течение 1...2 суток. Когда лецитин полностью

растворится, доводят объем до метки жидким парафином. Раствор хранят в холодильнике в течение одного года.

Раствор субстрата. 600 мг казеината натрия растворяют в 95 г воды. Добавляют 0,5 мл раствора лецитина и 1,0 мл глицерилтрибутирата, перемешивают в течение 60 с. Субстрат переносят в колбу или химический стакан и выдерживают при комнатной температуре при перемешивании магнитной мешалкой. Срок хранения субстрата – не более 4 ч.

Раствор липазы. Для приготовления раствора жидкой пробы липазы в мерную колбу вместимостью 100 мл отбирают пипеткой требуемое количество жидкой пробы липазы или контрольной пробы с целью получения 100 мл раствора липазы с концентрацией 4 ± 1 Е/мл. Доводят объем водой до метки. Допускается анализировать пробу без разбавления, если активность липазы 5 Е/мл или ниже.

Приготовление раствора порошкообразной пробы липазы проводится следующим образом. Сначала порошок липазы осторожно перемешивают до достижения однородности. Затем в химическом стакане взвешивают требуемое количество пробы для получения 100 мл раствора липазы концентрацией 4 ± 1 Е/мл.

Растворяют анализируемую пробу липазы или контрольную пробу в 90 мл воды при постоянном энергичном перемешивании. Проверяют значение pH и доводят его, при необходимости, до значения $8,50 \pm 0,10$ раствором гидроксида натрия (0,1 моль/л). После полного растворения в течение не менее 20 мин раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем водой до метки.

Раствор липазы переносят в сухой химический стакан и непрерывно перемешивают. Раствор анализируют не позднее чем через 2 ч после приготовления пробы липазы. Записывают коэффициент разбавления d (равный общему объему в мл на г или в мл на мл пробы).

Ход работы.

Водяную баню нагревают до 42 °С, заполняют бюретку раствором гидроксида натрия и добавляют 10 мл субстрата в реакционный сосуд. Затем добавляют пипеткой 1 мл анализируемого раствора липазы к субстрату при интенсивном перемешивании с помощью магнитной мешалки, фиксируя исходное значение pH. Анализ проводят в течение 15 мин. В течение первых пяти минут pH смеси должен достигнуть величины $\approx 6,2$. При уменьшении значения pH ниже этой величины его корректируют добавлением гидроксида натрия. Если в течение первых двух минут pH смеси остается выше значения 6,20, к смеси добавляют раствор HCl (0,1 моль/л) до достижения нужного значения. Объем израсходованного раствора NaOH фиксируется в течение последних 10 мин анализа. При необходимости анализ повторяют.

Обработка результатов.

Активность липазы в анализируемой пробе (Ел) в международных единицах липазы Е на 1 г или 1 мл рассчитывают по формуле:

$$E_{\text{л}} = \frac{V \cdot c \cdot f_1 \cdot d}{t \cdot f_2},$$

где V – объем израсходованного раствора гидроксида натрия, мл;

c – молярная концентрация раствора гидроксида натрия, взятого для титрования, мл;

f_1 – коэффициент пересчета миллиграммов масляной кислоты в микрограммы ($f_1 = 1000$);

f_2 – коэффициент пересчета активности на 1,25 мкмоль/мин в соответствии с определением ($f_2 = 1,25$);

d – коэффициент разбавления пробы;

t – время, в течение которого фиксировался расход раствора гидроксида натрия ($t = 10$ мин).

Контрольные вопросы:

1. Какие реакции катализируют липазы?
2. Как классифицируются липазы?
3. На чём основан метод определения активности липаз?
4. С какой целью при определении активности липаз используется глицерилтрибутират?
5. Что произойдет, если исключить из методики определения активности использование эмульгатора?

Контрольные работы

Вариант 1

1. Основные этапы приготовления хлеба из пшеничной муки.
2. Технологическая схема производства сухого картофельного крахмала.
3. Технология производства квашеной капусты.

Вариант 2

1. Основное и дополнительное сырье хлебопекарного производства.
2. Технологическая схема производства солода.
3. Сырье для производства спирта. Технология получения спирта из крахмалсодержащего сырья.

Вариант 3

1. Основные этапы приготовления хлеба из ржаной муки.
2. Характеристика сырья для пивоваренного производства.
3. Общая технологическая схема производства виноградных вин.

Вариант 4

1. Технологическая схема производства пива.
2. Подготовка сырья к производству в хлебопечении.
3. Производство неосветлённых плодовых и ягодных соков.

Вариант 5

1. Характеристика, ассортимент и технология квасов, вырабатываемых методом брожения.
2. Технологическая схема производства крахмальной патоки.
3. Производство настоев и отваров из растительного сырья.

Вариант 6

1. Способы приготовления пшеничного теста.
2. Технологическая схема производства глюкозно-фруктозных сиропов.
3. Сушка солода. Процессы, протекающие в солоде при сушке. Типы сушилок.

Вариант 7

1. Характеристика и свойства микроорганизмов, применяемых в производстве пива и кваса.
2. Производство осветлённых плодовых и ягодных соков.
3. Характеристика основных дефектов вин и способов их устранения.

Вариант 8

1. Способы приготовления ржаного теста.
2. Производство концентрированных томатопродуктов.
3. Технология получения суслу из винограда.

Вариант 9

1. Классификация пива. Общие технические требования к пиву, его пищевая ценность.
2. Получение и применение модифицированных крахмалов.
3. Соление огурцов и томатов. Хранение соленой продукции.

Вариант 10

1. Производство газированных безалкогольных напитков.
2. Характеристика видов солода, используемых в пивоварении.
3. Производство овощных натуральных консервов.

Вариант 11

1. Общая технологическая схема производства кисломолочных напитков. Обоснование режимов тепловой и механической обработки.
2. Технологическая схема производства вареных колбас.
3. Технология производства соленой рыбы. Способы посола.

Вариант 12

1. Современные способы увеличения сроков годности кисломолочных напитков.
2. Технология и техника замораживания мяса. Режимы и допустимые сроки хранения.
3. Технология производства рыбы холодного копчения. Режимы хранения продукции.

Вариант13

1. Схема технологического процесса производства сметаны.
2. Размораживание мяса. Классификация методов, их характеристика и технологическая оценка.
3. Технология производства рыбы горячего копчения. Режимы хранения продукции.

Вариант 14

1. Общая технологическая схема производства творога.
2. Основное и вспомогательное сырье для производства колбасных изделий. Характеристика, особенности подготовки.
3. Технология производства пряносоленой и маринованной рыбной продукции.

Вариант15

1. Основные направления переработки вторичного молочного сырья с применением биотехнологических методов.
2. Мясные эмульсии. Факторы, влияющие на стабильность мясных эмульсий.
3. Технология и техника замораживания рыбы.

Вариант16

1. Основные операции и режимы технологического процесса производства полутвердых сычужных сыров.
2. Приготовление мясных эмульсий. Физико-химическая сущность процесса.
3. Технология и техника охлаждения и хранения охлажденной рыбы.

Вариант 17

1. Технология кисломолочного масла методом сбивания сливок.
2. Технология и техника охлаждения и хранения охлажденного мяса.
3. Технология производства натуральных рыбных консервов.

Вариант 18

1. Технология кисломолочного масла методом преобразования высокожирных сливок.
2. Производство сырокопченых колбас. Направленное использование микрофлоры в колбасном производстве.
3. Технология производства рыбных пресервов.

Вариант 19

1. Технология мягких сыров на примере сыра Рокфор.
2. Производство сыровяленых колбасных изделий.
3. Производство белковых продуктов из гидробионтов.

Вариант 20

1. Технологическая схема производства лактулозы.
2. Современные пути увеличения сроков хранения охлажденного
3. Технология производства рыбных консервов в масле.

Список литературы

1. ГОСТ 27839-2011 Мука Пшеничная. Методы определения количества и качества клейковины. - М.: Стандартинформ, 2011. – 10 с.
2. ГОСТ Р 54330-2011 Ферментные препараты для пищевой промышленности. Методы определения амилалитической активности. – Введ. 2013–01–01. – М.: Стандартинформ, 2011. – 14 с.
3. ГОСТ Р 53974-2010 Ферментные препараты для пищевой промышленности. Метод определения протеолитической активности. – Введ. 2012–01–01. – М.: Стандартинформ, 2012. – 10 с.
4. Антипова Л.В. Технология обработки сырья: мясо, молоко, рыба, овощи: учебное пособие для среднего профессионального образования/ Л.В. Антипова, О.П. Дворянинова; под научной редакцией Л.В. Антиповой. - 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Издательство Юрайт, 2021. – 204 с.- (Профессиональное образование).- ISBN 978-5-534-13610-4. - Текст электронный.
5. Антипова Л.В. Биотехнология пищи: физические методы: учебное пособие для вузов/ Л.В. Антипова, С.С. Антипов, С.А. Титов. – М.: Издательство Юрайт, 2021. – 210с. (Высшее образование). – ISBN978-5-534-13162-8. - Текст: электронный.
6. Антипова Л.В. Основы биотехнологии переработки сельскохозяйственной продукции: учебное пособие для вузов/ Л.В. Антипова, О.П. Дворянинова; под научной редакцией Л.В. Антиповой. - 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Издательство Юрайт, 2021. – 204с. - (Высшее образование).- ISBN978-5-534-12435-4. - Текст: электронный .
7. Биотехнология растений: учебник и практикум для вузов/ Л.В. Назаренко, Ю.И. Долгих, Н.В. Загоскина, Г.Н. Ралдугина. 2-е изд., испр. и доп. – М.: Издательство Юрайт, 2021. – 161с. - (Высшее образование) – ISBN978-5-534-05619-8. - Текст электронный.
8. Биотехнология: учебник и практикум для вузов/ под редакцией Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. - 3-е изд., испр. и доп. – М.: Издательство Юрайт, 2021. – 381с. - (Высшее образование). – ISBN978-5-534-13546-. - Текст электронный.
9. Волова Т.Г. Введение в биотехнологию. - Красноярск: ИПК СФУ, 2008. – 180 с.
10. Донченко Л.В. Безопасность пищевой продукции. В 2 ч. Часть 1: учебник для вузов/ Л.В. Донченко, В.Д. Надыкта. - 3-е изд., испр. и доп. – М.: Издательство Юрайт, 2021. – 264 с. - (Высшее образование).- ISBN 978-5-534-05915-1. - Текст электронный.
11. Донченко Л.В. Безопасность пищевой продукции. В 2 ч. Часть 2: учебник для вузов/ Л.В. Донченко, В.Д. Надыкта. - 3-е изд., испр. и доп. – М.: Издательство Юрайт, 2021. – 161 с. - (Высшее образование).- ISBN978-5-534-05916-8. - Текст

электронный.

12. Егорова Т.А. Основы биотехнологии /под. ред. Т.А. Егоровой, С.М. Клуновой, Е.А. Живухиной. - М.: Академия, 2003. – 208 с.
13. Загоскина Н.В., Назаренко Л.В. Биотехнология. - М.: Юрайт, 2020.–381 с.
14. Мглинец А.И. Технология продукции общественного питания/А.И. Мглинец, Н.А. Акимова, Г.Н.Дзюба и др.; Под. ред. А.И. Мглинца - СПб.:Троицкий мост, 2010.-736 с.
15. Неверова О.А. Пищевая биотехнология продуктов из сырья растительного происхождения: учеб. для вузов / О.А. Неверова. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. – 415 с.
16. Нечаев А. Технологии пищевых производств/А. Нечаев, И. Шуб, О. Аношина // Учеб. для вузов. – М.: КолосС, 2008. – 768 с.
17. Поздняковский В.М. Экспертиза напитков /В.М. Поздняковский, В.А. Помозова, Т.Ф. Киселева, Л.В. Пермякова.– Новосибирск: Издательство Новосибирского университета, 2007. – 332 с.
18. Рогов И.А., Антипова Л.В., Шуваева Г.П. Пищевая биотехнология. – М.: КолосС, 2004. Книга 1. – 440 с.
19. Сазыкин Ю.О., Орехов С.Н., Чакалева И.И. Биотехнология. – М.: Академия, 2015. - 256 с.
20. Ферменты в пищевой промышленности / под ред. Р.Д. Уайтхерста. - М.: Оорта. СПб.: Профессия, 2014. – 405 с.
21. Чечина О.Н. Общая биотехнология: учебное пособие для вузов/ О.Н. Чечина.- 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Издательство Юрайт, 2021. – 266 с. - (Высшее образование). – ISBN978-5-534-13660-9. - Текст электронный.

Приложение

Приложение 1

Соотношение между массовой долей сухих веществ, плотностью и концентрацией сахара в растворах

Массовая доля СВ, %	Плотность, г/см ³	Конц. сахара, г/л	Массовая доля СВ, %	Плотность, г/см ³	Конц. сахара, г/л
0,2	1,0008	1,99	3,4	1,0133	34,39
0,4	1,0016	3,99	3,6	1,0141	36,44
0,6	1,0023	6,00	3,8	1,0149	38,49
0,8	1,0031	8,00	4,0	1,0157	40,55
1,0	1,0039	10,00	4,2	1,0165	42,61
1,2	1,0047	12,03	4,4	1,0173	44,68
1,4	1,0055	14,05	4,6	1,0181	46,74
1,6	1,0062	16,07	4,8	1,0189	48,81
1,8	1,0070	18,09	5,0	1,0197	50,89
2,0	1,0078	20,12	5,2	1,0205	52,96
2,2	1,0086	22,14	5,4	1,0213	55,05
2,4	1,0094	24,18	5,6	1,0221	57,18
2,6	1,0102	26,21	5,8	1,0229	59,22
2,8	1,0109	28,25	6,0	1,0237	61,31
3,0	1,0117	30,28	6,2	1,0245	63,40
3,2	1,0125	32,34	6,4	1,0253	65,50

Приложение 3

Сравнительные данные по определению активности каталазы в различных биологических объектах методом титрования и предлагаемым способом

Образец	Определение каталазы по способу титрования		Определение активности каталазы по предлагаемому способу	
	Результат титрования	Активность каталазы, Е	Оптическая плотность	Активность каталазы
Картофель	4,84	33,84	0,6	30,1
Люцерна	2,68	51,73	0,992	49,6
Саксаул	1,85	28,76	0,58	29,0
Терескен	2,74	63,99	1,29	64,5
Полынь бадхизская:				
№ 1	2,9	68,59	1,38	69,0
№ 2	2,89	62,71	1,26	63,0
№ 3	2,94	67,59	1,36	68,0
№ 4	3,1	75,46	1,52	76,0
Яблоки	2,62	53,33	1,05	52,69

Приложение 4

Стандартная таблица определения активности каталазы
в биологических объектах

I

Величина оптической плотности	Соответствующая ей активность каталазы, Е
0,02	1
00,4	2
0,06	3
0,08	4
0,10	5
0,12	6
0,14	7
0,16	8
0,18	9
0,20	10
0,22	11
0,24	12
0,26	13
0,28	14
0,30	15
0,32	16
0,34	17
0,36	18
0,38	19
0,40	20
0,42	21
0,44	22
0,46	23

Приложение 5

Соотношение между относительной плотностью жидкости и массовой долей экстрактивных веществ

$\rho \frac{20^{\circ}C}{20^{\circ}C}$	E, %	$d \frac{20^{\circ}C}{20^{\circ}C}$	E, %	$d \frac{20^{\circ}C}{20^{\circ}C}$	E, %	$d \frac{20^{\circ}C}{20^{\circ}C}$	E, %
1,0030	0,770	1,0190	4,830	1,0350	8,781	1,0510	12,624
1,0035	0,898	1,0195	4,955	1,0355	8,902	1,0515	12,743
1,0040	1,026	1,0200	5,080	1,0360	9,024	1,0520	12,861
1,0045	1,155	1,0250	5,205	1,0365	9,145	1,0525	12,979
1,0050	1,283	1,0210	5,330	1,0370	9,267	1,0530	13,098
1,0055	1,411	1,0215	5,455	1,0375	9,388	1,0535	13,215
1,0060	1,539	1,0220	5,580	1,0380	9,509	1,0540	13,333
1,0065	1,667	1,0225	5,704	1,0385	9,631	1,0545	13,451
1,0070	1,795	1,0230	5,828	1,0390	9,751	1,0550	13,569
1,0075	1,923	1,0235	5,952	1,0395	9,873	1,0555	13,687
1,0080	2,053	1,0240	6,077	1,0400	9,993	1,0560	13,804
1,0085	2,178	1,0245	6,200	1,0405	10,114	1,0565	13,921
1,0090	2,305	1,0250	6,325	1,0410	10,234	1,0570	14,039
1,0095	2,432	1,0255	6,449	1,0415	10,355	1,0575	14,156
1,0100	2,560	1,0260	6,572	1,0420	10,475	1,0580	14,273
1,0105	2,687	1,0265	6,696	1,0425	10,596	1,0585	14,390
1,0110	2,814	1,0270	6,819	1,0430	10,716	1,0590	14,507
1,0115	2,940	1,0275	6,943	1,0435	10,836	1,0595	14,624
1,0120	3,067	1,0280	7,066	1,0440	10,956	1,0600	14,751
1,0125	3,194	1,0285	7,189	1,0445	11,075	1,0605	14,857
1,0130	3,321	1,0290	7,312	1,0450	11,195	1,0610	14,974
1,0135	3,447	1,0295	7,435	1,0455	11,315	1,0615	15,090
1,0140	3,573	1,0300	7,558	1,0460	11,435	1,0620	15,207
1,0145	3,699	1,0305	7,681	1,0465	11,554	1,0625	15,323
1,0150	3,826	1,0310	7,803	1,0470	11,673	1,0630	15,439
1,0155	3,951	1,0315	7,926	1,0475	11,792	1,0635	15,555
1,0160	4,077	1,0320	8,048	1,0480	11,912	1,0640	16,671
1,0165	4,203	1,0325	8,171	1,0485	12,031	1,0645	15,787
1,0170	4,329	1,0330	8,293	1,0490	12,150	1,0650	15,903
1,0175	4,454	1,0335	8,415	1,0495	12,268	1,0655	16,019
1,0180	4,580	1,0340	8,537	1,0500	12,387	1,0660	16,113
1,0185	4,705	1,0345	8,659	1,0505	12,506	1,0665	16,249

Приложение 6

Микробиологические показатели творога (ТР ТС 033/2013)

Наименование продукта	Количество микроорганизмов, КОЕ/г	Масса продукта (г), в которой не допускаются			Дрожжи (Д), плесени (П), КОЕ/г, не более
		БГКП (коли-формы)	Патогенные, в том числе сальмонеллы	<i>S.aureus</i>	
Творог без компонентов (кроме произведенного с использованием ультрафильтрации, сепарирования, зерненого творога) а) со сроком годности не более 72 ч	Молочно-кислых микроорганизмов не менее $1 \cdot 10^6$	0,001	25	0,1	—
б) со сроком годности более 72 ч	То же	0,01	25	0,1	Д-100; П-50

Творог, произведенный с использованием ультрафильтрации, сепарирования: а) со сроком годности не более 72 ч	Микрофлора, характерная для творожной закваски, отсутствие посторонней микрофлоры	0,01	25	0,1	—
б) со сроком годности более 72 ч	То же	0,01	25	0,1	Д-50; П-50
Творог зерненный	То же	0,01	25	0,1	Д-100; П-50
Творог с компонентами, творожная масса, сырки творожные: а) со сроком годности не более 72 ч	То же	0,001	25	0,1	—
б) со сроком годности более 72 ч	То же	0,01	25	0,1	Д-100; П-50
Творожные продукты: а) со сроком годности не более 72ч	То же	0,01	25	0,1	—
б) со сроком годности более 72 ч	То же	0,01	25	0,1	Д-100; П-50

ОТЧЕТ
проведения лабораторной работы по дисциплине
«Пищевая биотехнология»

Дата заполнения	Фамилии исполнителей:	
группа		
1. Название работы:		
2. Цель и задачи работы:	Цель работы:	
	Задачи работы:	
3. Принцип метода (теоретические основы)		
4. Последовательность проводимых операций		
Название этапа	Ход работы	Сырье и материалы
5. Результаты экспериментальных наблюдений и измерений		
6. Выводы		

Работу выполнили:

Работу принял:

« ____ » _____ 20 ____ г.

ПИЩЕВАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

методические указания по выполнению лабораторных работ

**направление подготовки 19.03.01 – Биотехнология
(профиль Биотехнология)**

Разумкова Г.М., Решетникова О.В.

Главный редактор: Краснова Наталья Александровна – кандидат экономических наук, доцент, руководитель НОО «Профессиональная наука»

Технический редактор: Канаева Ю.О.

Подписано в печать

Формат 60x85 1/16.

Бумага офсетная. Усл. печ. л. 4,6

Издательство: НОО «Профессиональная наука»



ISBN 978-5-907607-24-8



Усл. печ. л. 4,6.
Объем издания 2,9 МВ
Оформление электронного издания:
НОО Профессиональная наука, mail@scipro.ru
Дата размещения: 30.03.2023 г.
URL: http://scipro.ru/conf/FOOD_BIOTECHNOLOGY.pdf