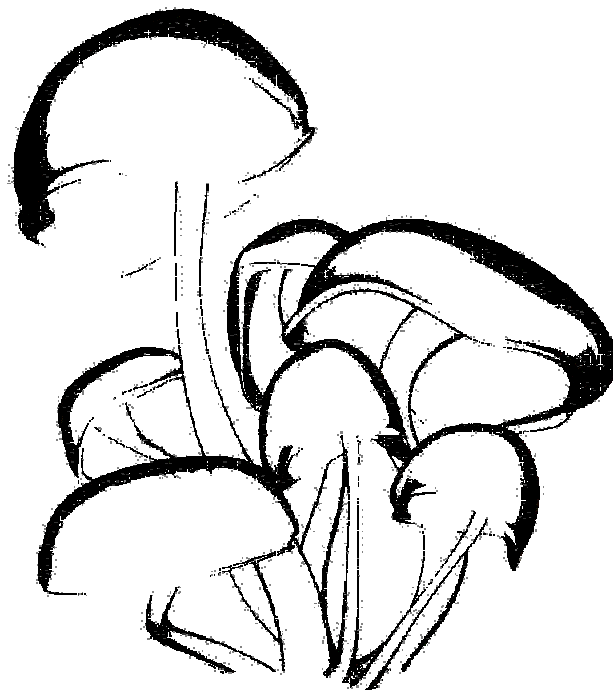


ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПИЩЕВОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ



ИЗДАТЕЛЬСТВО ТГТУ

УДК 664 (075)
ББК Л81я73-5
Т338

Утверждено Редакционно-издательским советом университета

Рецензент:

Доктор технических наук, профессор ТГТУ
А.И. Леонтьева

Составители:

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

Лабораторные работы предназначены для закрепления теоретических знаний, а также формирования практических навыков работы с биологическими объектами и анализа основных закономерностей их поведения на отдельных этапах биотехнологического производства.

Приведены методические указания для подготовки, выполнения и обработки полученных результатов, вопросы для самоконтроля.

Предназначены для студентов 4 курса дневного отделения специальности 240902.

УДК 664 (075)

ББК Л81я73-5

© ГОУ ВПО «Тамбовский государственный
технический университет» (ТГТУ), 2006
Министерство образования и науки Российской Федерации

ГОУ ВПО «Тамбовский государственный технический университет»

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПИЩЕВОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Лабораторные работы



Тамбов
◆ Издательство ТГТУ ◆
2006

Учебное издание

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПИЩЕВОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Лабораторные работы

Составители:

ЗЮЗИНА Ольга Владимировна,
ШУНЯЕВА Оксана Борисовна,
МУРАТОВА Евгения Ивановна,
ИВАНОВ Олег Олегович

Редактор В.Н. Митрофанова
Компьютерное макетирование М.А. Филатовой

Подписано в печать 7.12.2006

Формат 60 × 84 / 16. Бумага офсетная. Гарнитура Times New Roman.
2,7 уч.-изд. л. Тираж 100 экз. Заказ № 748

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

ПОЛУЧЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель работы: приобретение опыта по выделению чистой культуры микроорганизмов.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

В биотехнологических производствах в качестве одного из видов исходных материалов используют чистую культуру микроорганизмов.

Чистой культурой (ЧК) называют популяцию, представляющую собой потомство одной или нескольких клеток одного вида микроорганизмов. В генетических исследованиях пользуются **клонами** – чистыми культурами, полученными от одной споры или гаплоидной клетки.

В естественных условиях различные объекты содержат, как правило, смешанную микрофлору. Для диагностических исследований с целью выяснения возбудителей порчи пищевых продуктов или их обсемененности микроорганизмами требуется выделение чистой культуры. Методы выделения ЧК могут быть *прямыми* и *косвенными*. Прямые – основаны на выделении под непосредственным контролем через микроскоп, например метод Линднера. Известны методы извлечения одной клетки из взвеси микроорганизмов с помощью специальных приборов (микроманипулятор, микроселектор Перфильева) под контролем микроскопа. Однако наиболее распространенным способом выделения чистых культур являются косвенные методы выделения чистой культуры микроорганизмов, основанные на изоляции одной микробной клетки от массы микроорганизмов и последующем выращивании потомства этой клетки на питательных средах изолированно от других видов.

Для посева чаще используются агаризованные среды в чашках Петри. Этот метод предложен известным немецким микробиологом Кохом и носит название метода пластинчатых (или чашечных) культур Коха.

Основной задачей метода является разведение концентрации микроорганизмов в исследуемом материале с таким расчетом, чтобы при посеве его на питательной среде выросли изолированные колонии. Существуют два основных метода разведения исследуемого материала:

- 1) на поверхности плотной питательной среды «методом истощающего посева»;
- 2) предварительное разведение материала в физиологическом растворе или стерильной водопроводной воде в пробирках и высев готового разведения на плотную питательную среду.

Метод **истощающего посева** на поверхности плотной среды используется для выделения чистых культур аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов. С этой целью для посева берут ряд чашек Петри с плотной средой; в первую чашку наносят исследуемый материал и распределяют его по поверхности шпателем Дригальского или бактериологической петлей. Затем, не стерилизуя шпатель (или петлю), производят посев последовательно на поверхность среды в остальных чашках (рис. 1). Количество материала, внесенного в среду, при этом последовательно убывает (истощающий посев).

Метод **предварительного разведения** исследуемого материала в стерильной водопроводной воде (или физиологическом растворе) используется для выделения чистых культур микроорганизмов, как аэробных, так и анаэробных. Готовят разведения материала в 10 – 100 раз и более (в зависимости от предполагаемой обсемененности микроорганизмами) и производят посев разведений, пользуясь поверхностным или глубинным методом (рис. 2).

Выделение чистых культур строгих анаэробов по методу Коха требует условий выращивания без доступа кислорода.

Если разведение исследуемого материала выполнено правильно, на поверхности среды или в ее толще (в зависимости от метода посева) образуются изолированные колонии микроорганизмов, видимые невооруженным глазом.

Каждая колония состоит из клеток одного вида, однако для выделения чистой культуры необходимо пересеять колонию на отдельную среду, т.е. изолировать ее от микроорганизмов других видов.

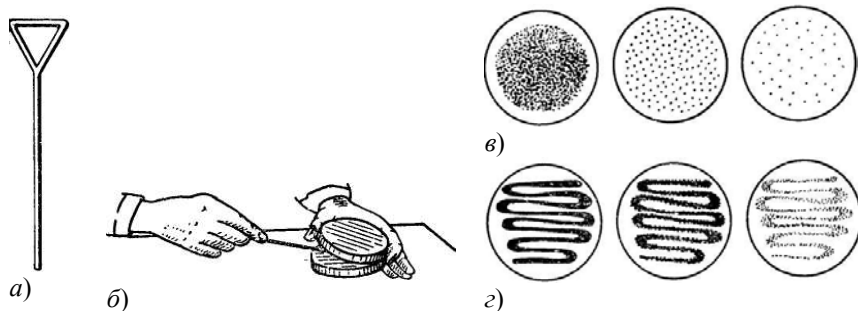


Рис. 1. Посев микроорганизмов на поверхность плотной среды в чашках Петри:

а – шпатель Дригальского; *б* – положение чашки и руки при посеве шпателем; *в* – рост микроорганизмов после посева шпателем; *г* – рост микроорганизмов после посева петлей

Завершающим этапом выделения чистой культуры микроорганизмов неизвестного вида является проверка ее чистоты на изолированной среде визуально (просмотр посева невооруженным глазом) и микроскопией мазка.

Видовое название чистых культур большинства микроорганизмов устанавливают путем изучения морфологических, культуральных и физиологических свойств. Для идентификации плесневых грибов достаточно изучить морфологические и культуральные свойства. По совокупности изученных признаков определяют таксономическое положение (положение в систематике) микроорганизмов, пользуясь специальными определителями.

Морфологические свойства исследуют при микроскопии прижизненных или фиксированных окрашенных препаратов. Морфологическая характеристика микроорганизма должна включать форму клеток, их сочетание и размеры, подвижность, способность к образованию спор, наличие включений. При описании морфологии следует указывать возраст культуры, состав среды, условия культивирования.

Культуральные свойства микроорганизмов устанавливают по особенностям роста на питательных средах. На жидких питательных средах отмечают характер распределения культуры – равномерное, вызывающее помутнение среды, придонное или поверхностное, что обусловлено отношением микроорганизмов к кислороду воздуха. Мутность среды может быть хлопьевидной, однородной. Пленка – тонкой, плотной и рыхлой, гладкой, морщинистой или складчатой. Осадок – скудным или обильным (количество); плотным, рыхлым, слизистым (консистенция).

На плотных питательных средах исследуют характер колоний. Поскольку колония образуется в результате размножения одной клетки, то ее строение зависит от особенностей деления клеток данного вида микроорганизмов. Наиболее типично видовые признаки выражены у поверхностных колоний:

- форму, профиль, блеск и цвет отмечают визуально;
- край и структуру – при малом увеличении микроскопа;
- консистенцию (мягкая, слизистая, тягучая или хрупкая) определяют прикосновением к ее поверхности петлей;
- размеры – обычной линейкой или окулярным микрометром при малом увеличении микроскопа (колонии точечные – менее 1 мм в диаметре, мелкие – 1–2, крупные – более 4 мм).

Физиологические свойства микроорганизмов обусловлены ферментативной активностью и, следовательно, выражают особенности обмена веществ клетки. Это важный дифференциальный признак, который используется при идентификации бактериальных и дрожжевых видов. Распространенным методом изучения физиологических свойств микроорганизмов является выращивание их на дифференциально-диагностических средах, позволяющих определить биохимическую активность микроорганизмов в отношении веществ, введенных в среду.

Отношение к кислороду (тип дыхания) определяется по характеру роста в столбике агара (МПА) при посеве уколом. После инкубации в термостате в течение 48 ч при температуре 30 – 38 °С возможны три типа роста в зависимости от типа дыхания:

- рост шляпкой на поверхности (аэробные микроорганизмы);
- рост у дна пробирки (анаэробные микроорганизмы);
- рост, равномерный по всей длине укола (факультативно анаэробные микроорганизмы).

Протеолитические свойства определяют по выделению из питательной среды газов – продуктов расщепления белка; для этой цели культуру выращивают на МПБ или мясной воде, закрепив в пробирке полоску фильтровальной бумажки, пропитанную реактивом, реагирующим на наличие определенного газа. Так, выделение аммиака обнаруживают по синему цвету лакмусовой бумажки, сероводорода – с помощью фильтровальной бумаги, пропитанной уксуснокислым свинцом (бумага чернеет в результате образования сернистого свинца), индола – с помощью бумажки, пропитанной щавелевой кислотой (покраснение в результате образования соединения с индолом).

О протеолитических свойствах микробов судят также по способности разжижать желатин. При посеве уколом в столбик желатина через 2 часа культивирования отмечают наличие и характер разжижения – послойное, воронкообразное, пузырчатое.

Сахаролитические свойства определяют на МПБ, 1 %-ном растворе пептонной воды и др., содержащих тот или иной углевод и индикатор. Расщепление углеводов под влиянием микробов сопровождается изменением цвета индикатора в результате подкисления среды, а на жидких средах в ряде случаев и газообразованием, которое улавливают с помощью стеклянного «поплавка». Образовавшийся газ вытесняет среду и обнаруживается в поплавке в виде пузырька.

Характер свертывания лакмусового молока является важным биохимическим признаком. При посеве на лакмусовое молоко отмечают изменения pH и характер сгустка. В зависимости от того, на какую составную часть молока действуют ферменты изучаемого микроорганизма, различают следующие изменения в молоке:

- а) кислотное свертывание – действие фермента на лактозу – сопровождается образованием плотного сгустка и повышением кислотности; цвет молока изменяется от сиреневого к красному;
- б) пептонизация – действие протеолитических ферментов на белки молока – сопровождается образованием мутной желтоватой жидкости, среда становится щелочной из-за выделения аммиака и молоко синее.

О способности расти на картофеле выявляют при посеве микроорганизмов на скошенный стерильный ломтик картофеля. При этом отмечают дополнительный культуральный признак, а также амилолитическую способность культуры по пробе с йодом. Посинение среды после нанесения капли раствора Люголя в зоне роста микроорганизмов указывает на наличие у них фермента амилазы.

Следует подчеркнуть, что перечень исследуемых признаков, как и методы культивирования, дифференци-

руется в зависимости от предполагаемого вида микроорганизмов.

Методика выполнения работы

Работа выполняется в два этапа. На первом этапе (первое занятие) студенты используют пищевые продукты, имеющие один или несколько пороков микробного происхождения для выделения чистой культуры и визуального изучения.

Занятие 1

В лабораторном журнале указывают по следующей схеме исходные данные исследуемого объекта:

Наименование объекта

Органолептические показатели продукта:

Цвет _____

Запах _____

Консистенция _____

Характеристики микробиологического порока:

Внешний вид _____

Цвет _____

Затем следует приготовить препарат «раздавленная капля» для дрожжевых и микроскопических грибов и «фиксированный мазок для бактерий». Провести микроскопирование, выполнить микрофотографии и описать морфологические признаки препаратов: формы клеток, их сочетание и размеры, способность к образованию спор, форму спораносцев.

По окончании изучения необходимо классифицировать выявленные микроорганизмы по их принадлежности – микомицеты, дрожжи, бактерии.

Далее выполняются операции по выделению чистой культуры микроорганизмов методом Дригальского.

Техника выполнения посева по методу Дригальского

1. Взять каждому студенту для посева по две чашки Петри с мясопептонным агаром (для бактерий) или сусло-агаром (для дрожжей и микомицетов).

2. Надписать их по торцу крышки, указав дату, номер чашки, инициалы, поставить на стол крышками вверх.

3. С помощью профламбированной бактериологической петли взять небольшое количество изучаемого материала и внести в пробирку с 5 мл стерильной воды и хорошо перемешать.

4. Одну каплю такой взвеси с помощью петли или стерильной пипетки нанести на поверхность агара первой чашки. Стерильным шпателем Дригальского аккуратно и тщательно распределить по всей поверхности среды. Этим же шпателем (не фламбируя его) проводят по поверхности второй, при необходимости третьей чашки. По окончании посева шпатель погружают в дезинфицирующий раствор.

5. Чашки переворачивают вверх дном, чтобы накапливающаяся конденсационная вода при застывании среды и росте культуры не стекала с крышки и не размывала рост. Поставить подготовленные посева в термостат, чашки с МПА при температуре 37 °С, с сусло-агаром при – 32 °С.

6. Оформить протокол занятия.

Занятие 2

Второй этап работы осуществляется на следующем занятии и состоит из подсчета количества колоний, выросших на чашках Петри, описания их культуральных признаков, микроскопического контроля чистоты культуры в колониях; изоляции чистой культуры на скошенный агар в пробирку. Для этого выполняют действия в следующей последовательности.

1. Визуально, не открывая крышки чашки Петри, описать культуральные признаки колоний микроорганизмов преобладающего типа на плотных средах (МПА, СА):

Положение в среде (поверхностное или глубинное) _____

Форма колонии _____

Размер колонии _____

Профиль _____

Блеск _____

Цвет _____

Используя малое увеличение микроскопа отметить для колонии _____

Форму края _____

Структуру _____

Для бактерий и дрожжей прикосновение к поверхности петли определяют консистенцию (мягкая, слизистая, тягучая, хрупкая) _____

Консистенция _____

2. Провести микроскопирование колонии.

Для этого из небольшой части колонии приготовить фиксированный мазок и окрасить его фуксином. Микроскопировать с использованием иммерсионного объектива. Наличие однородных клеток свидетельствует о чистоте культуры. Выполнить микрофотографию.

3. Пересеять культуру изученной колонии на скошенный агар в пробирку. Соблюдая условия стерильности, отобрать бактериологической петлей часть микробной биомассы и посеять ее штрихом на поверхность скошенного агара. Операции по пересеву желательно выполнять вдвоем: один приоткрывает крышку чашки Петри; второй в это время вынимает пробку, отбирает петлей материал и распределяет его штрихом по поверхности среды и закрывает пробкой пробирку. Со стороны агара на стенке пробирки указывают дату посева, ФИО и номер группы.

4. Оформить протокол.

Форма отчета по лабораторной работе 1

1. Название работы, дата выполнения.
2. Цель работы.
3. Определение терминов «чистая культура», «клон».
4. Наименование методов выделения чистой культуры прямым и косвенным способами.
5. Сущность методов выделения ЧК.
6. Перечислить операции по выделению чистой культуры методом Дригальского.
7. Схема записи результатов первого занятия, микрография.
8. Перечень технических приемов, используемых для изучения культуральных и морфологических признаков выделенной культуры на втором занятии, микрографии.
9. Схема записи результатов второго занятия.
10. Заключение о видовой принадлежности.

Контрольные вопросы

1. Что следует понимать под термином «чистая культура», «клон»?
2. Укажите назначение ЧК.
3. На каких приемах основаны методы выделения ЧК?
4. Назовите ученого предложившего метод выделения ЧК.
5. Чем отличаются методы выделения ЧК?
6. Перечислите последовательность операций метода Дригальского по выделению ЧК.
7. В чем заключается завершающий этап выделения ЧК?
8. Какие признаки устанавливают при идентификации ЧК?
9. Какие питательные среды рекомендуются для выделения ЧК?
10. Какие виды микробных поражений характерны для пищевых продуктов и продовольственного сырья?

Лабораторная работа 2

ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ РЕЖИМОВ СТЕРИЛИЗАЦИИ НА ГИБЕЛЬ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель работы: изучение эффективности режимов стерилизации физическими и химическими методами.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Ряд биотехнологических производств и отдельные стадии получения продукции с использованием биотехнологических приемов требуют обеспечения асептических условий.

Под асептическими условиями понимают мероприятия, режимы препятствующие попаданию контаминантов. Термином «*контаминанты*» обозначают постороннюю микрофлору, микроорганизмы-загрязнители.

Под поддержанием и созданием асептических условий в технологии следует понимать:

- обеспечение условий получения чистых культур в лаборатории и специализированных отделениях в растительных аппаратах, камерах;

- стерилизация, герметизация оборудования и коммуникаций;
- специальные приемы при введении добавок, посев, отбор проб;
- стерилизация пеногасителей, питательных сред, воздуха.

Под *стерилизацией* понимают полное освобождение любого материального потока, а также оборудования и коммуникации от жизнеспособных микроорганизмов, их спор.

Процессы, использование на практике которых, способствует достижению и поддержанию асептических условий, условно можно разделить на две группы: процессы, уничтожающие постороннюю микрофлору; процессы, удаляющие микроорганизмы из материального потока (рис. 3).

При выборе метода стерилизации следует учитывать чувствительность микроорганизмов к применяемым факторам, а также их численность, видовую принадлежность, содержание в них влаги, физиологическую форму (вегетативная, споры), возраст клеток спор, значение рН, химический состав, физические свойства среды и ее объем.

Гибель микроорганизмов при стерилизации обусловлена повреждением биологически важных макромолекул клетки и, как следствие, нарушение определенных физиологических функций. Так, отмирание клеток при

термообработке во влажной среде наступает из-за денатурации белков, и освобождения нуклеиновых кислот, инактивации ферментов, повреждения цитоплазматической мембраны. При воздействии

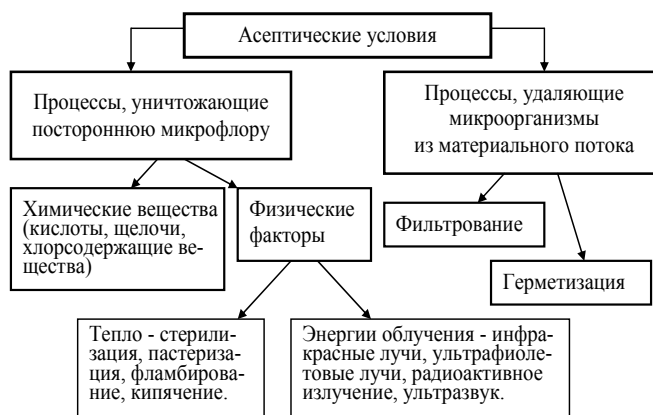


Рис. 3. Процессы асептических условий

на клетки сухого жара гибель происходит в результате активных окислительных процессов и нарушения клеточных структур.

В пищевых производствах на губительном действии высоких температур основаны многие приемы по уничтожению микроорганизмов в пищевых продуктах и других объектах, путем кипячения, варки, обжарки, пропаривания, бланширования, пастеризации, стерилизации.

Пастеризация – это нагревание материала при температуре ниже 100 °С в течение 20 – 40 мин. При пастеризации погибают не все микроорганизмы, так некоторые термоустойчивые бактерии, а также споры остаются живыми. Поэтому пастеризованные продукты следует немедленно охлаждать до 4 – 8 °С и хранить в холоде, чтобы задержать прорастание спор и развитие сохранившихся клеток. Пастеризации подвергают молоко, пиво, вино, икру, фруктовые соки.

Стерилизация – это термическая обработка при температурах выше 100 °С, в результате которой гибнут и вегетативные клетки и их споры. Стерилизуют баночные консервы, многие предметы и материалы в медицинской практике, питательные среды и оборудование в биотехнологическом производстве.

Воздействие на микроорганизмы различных форм **лучистой энергии**, представляющих собой электромагнитные колебания различной длины волн, проявляется по-разному и зависит от длины волны, дозы облучения. При облучении наиболее угнетаемыми в клетке процессами является окислительное фосфорилирование, изменяются физико-химические свойства нуклеопротеидов, происходят изменения в ДНК, нарушаются транскрипция, трансляция, функции мембран, угнетаются энергетические процессы. Возможны все виды мутаций: геномные – кратные изменения гаплоидного числа хромосом; хромосомные – структурные или численные изменения хромосом; генные или точковые – изменение молекулярной структуры генов, в результате синтезируются белки, утратившие свою биологическую активность.

Среди **химических веществ** можно выделить антисептики – губительно действующие на микроорганизмы (бактерицидные, фунгицидные) и задерживающие развитие (бактериостатические, фунгистатические). Эффективность действия антисептиков зависит от природы вещества, концентрации, биологических особенностей микроорганизмов, продолжительности воздействия, температуры, pH и состава среды. Более чувствительны к антисептикам вегетативные клетки, чем споры.

Из **неорганических соединений** сильнодействующими являются соли тяжелых металлов. Бактерицидное действие проявляют окислители Cl_2 , I_2 , H_2O_2 , $KMnO_4$, H_2SO_4 , HCl , H_2S , CO_2 , SO_2 .

Из **органических соединений** ядовиты для микроорганизмов фенолы, альдегиды, спирты, органические кислоты (салициловая, уксусная, бензойная, сорбиновая), эфирные масла, смолы, красители (генцианвиолет, фуксин, бриллиантовая зелень).

Механизм действия антисептиков различен:

- повреждение клеточной стенки и нарушение мембраны;
- нарушение обмена веществ в результате взаимодействия с компонентами клетки после проникновения в нее;
- воздействие на белки, ферменты;
- растворение липидов клеточных мембран;
- изменение pH среды.

Химические вещества используют для дезинфекции воды, тары, оборудования, инвентаря, как консерванты готовой продукции, сырья. Применение антисептиков ограничено и строго нормируется по дозе, цели обработки, назначению продукции.

Методика выполнения работы

Лабораторная работа выполняется в несколько этапов. На первом занятии студенты стерилизуют объекты при различных термических режимах, дозах излучения и химической обработкой. На втором занятии производят анализ результатов.

Занятие 1

Объектами для обработки является суспензия нескольких видов микроорганизмов: бактерий, дрожжей, спор микомицетов. Она подвергается воздействию термообработкой, облучением УФ – лучами и воздействию уксусной кислоты.

Для изучения **влияния величины температуры** на гибель микроорганизмов три пробирки с 10 мл исходной суспензии помещают поочередно на 15 мин в автоклав и стерилизуют, соответственно, при 0,5 атм (112 °С), при 1 атм (121 °С) и при 1,5 атм (127 °С). После стерилизации с соблюдением условий асептики стерильной пипеткой на 1 мл по одной капле обработанной суспензии вносят на поверхность агаризованной среды СА и МПА в чашки Петри и шпателем распределяют по поверхности. Чашки подписывают, переворачивают и помещают в термостат на 1–2 суток при 37 °С.

Следует определить количество клеток в исходной суспензии. Для этого из пробирки с исходной взвесью берется 1 мл и вносится в пробирку с 9 мл стерильной воды, затем 1 мл разведенной взвеси разбавляется в 100 и 1000 раз. Из этих пробирок по 1 капле вносят взвесь на чашки Петри с СА и МПА, растирают шпателем, подписывают и отправляют в термостат.

Для изучения **кинетики гибели клеток** одну пробирку с исходной суспензией, помещают в кипящую водяную баню и через каждые 15 мин в течение часа отбирают стерильной пипеткой (всякий раз новый) каплю суспензии и вносят на агаризованные пластинки с СА и МПА в чашки Петри. Растирают каплю шпателем по поверхности среды. Чашки подписывают, переворачивают и помещают в термостат.

Для **изучения влияния дозы облучения** из пробирок с исходными суспензиями микроорганизмами, стерильной пипеткой на поверхности четырех чашек с МПА и четырех чашек с СА вносят с соблюдением правил асептики по одной капле суспензии. Распределяют шпателем их по поверхности.

Устанавливают восемь чашек под бактерицидной лампой на расстояние 40 см. Через 10 мин вынимают первые две чашки, последующие попарно с интервалом 10 мин. Подписывают, переворачивают и устанавливают чашки Петри в термостат.

Для изучения **влияния концентрации органических кислот** на микроорганизмы используют четыре пробирки с исходной суспензией, в каждую из которых вносят ледяную уксусную кислоту по схеме (табл. 1).

1. Схема внесения реагента

Номер пробирки	1	2	3	4
Объем суспензии, мл	10	10	10	10
Количество ледяной уксусной кислоты, мл	0,01	0,02	0,03	0,04

Аккуратно взбалтывают содержимое пробирок и оставляют в покое на 15 мин. Затем из каждой пробирки стерильными пипетками отбирают по одной капле обработанной суспензии и наносят на агаризованную среду СА и МПА. Распределяют каплю по всей поверхности пластинки среды шпателем. Чашки подписывают, переворачивают и помещают в термостат.

Занятие 2

Результаты воздействия стерилизующих факторов оценивают число колоний на поверхности агаризованной среды, путем прямого подсчета. Для облегчения подсчета пластинку со стороны дна чашки делят на секторы и считают колоний по секторам. Полученные данные заносят в таблицы (табл. 2).

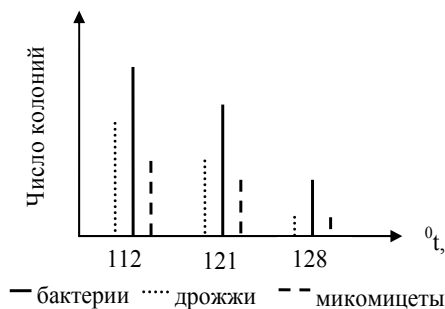
2. Результаты учета количества жизнеспособных организмов после обработки исходной суспензии

методом _____ при условиях _____
(наименование метода стерилизации)

Питательная среда	Бактерии		Дрожжи		Микомицеты	
	число колоний, шт	титр клеток, кл/мл	число колоний, шт	титр клеток, кл/мл	число колоний, шт	титр клеток, кл/мл
Сусло-агар						
Мясопептонный агар						

Для наглядности, следует выполнить диаграммы с использованием цветных фломастеров (рис. 4).

Рис. 4. Количество колоний жизнеспособных клеток после автоклавирования



Рассчитать для каждого режима величину критерия стерилизации Δ как натуральный логарифм отношения жизнеспособных клеток после обработки к исходному количеству клеток и построить график зависимости: $\Delta = f(t, ^\circ\text{C})$, $\Delta = f(\tau, \text{мин})$, $\Delta = f(c_{\text{асептика}}, \%)$.

По полученным результатам сделать развернутое заключение, которое должно содержать краткое изложение характера влияния стерилизующего фактора, механизм его действия на клетки микроорганизмов, условия эффективного воздействия фактора, область использования в пищевой биотехнологии этого фактора.

Форма отчета по лабораторной работе 2

1. Название лабораторной работы.
2. Цель работы.
3. Определения терминов «асептические условия», «стерилизация», «пастеризация».
4. Указать в виде схемы группы процессов, обеспечивающие асептические условия.
5. Указать последовательность операций для выполнения первого занятия.
6. Указать действия при выполнении второго занятия.
7. Оформить табл. 2.
8. Построить диаграммы.
9. Заполнить сводную табл. 3.

3. Сводная таблица по лабораторной работе 2

Титр, кл/мл	Бактерии		Дрожжи		Микомицеты	
	СА	МПА	СА	МПА	СА	МПА
Исходного материала						
После автоклавирования 15 мин						
0,5 атм (112 °C)						
1 атм (121 °C)						
1,5 атм (128 °C)						
После кипячения при 100 °C						
10 мин						
20 мин						
30 мин						
40 мин						
После облучения УФ лучами, мощностью 13 Вт						
15 мин						
30 мин						
45 мин						
60 мин						
После обработки уксусной кислотой						
1 капля						
2 капля						
3 капля						
4 капля						

Контрольные вопросы

1. Что понимают под асептическими?
2. Какие факторы внешней среды могут оказывать бактерицидное действие?
3. От каких параметров зависит интенсивность губительного воздействия?
4. Каковы причины гибели клеток микроорганизмов при воздействии высоких температур, излучения химических соединений?
5. Чем отличается пастеризация от стерилизации?
6. Какие химические вещества используют для обеспечения асептических условий?

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА НАКОПЛЕНИЕ АМИЛАЗЫ ПРИ ТВЕРДОФАЗНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ МИКОМИЦЕТА

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

Методические указания

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

В биотехнологических производствах твердофазное культивирование применяется при *биокомпостировании, при получении микотоксинов, органических кислот, ферментных препаратов, приготовлении различных блюд из зерновых, корнеплодов и плодов*.

Твердофазное культивирование микроскопических грибов было одним из первых способов промышленного получения ферментных препаратов. *Технология твердофазного культивирования продуцентов ферментов подразделяется на стадии получения посевного материала, производственной культуры, ферментного препарата*. Посевным материалом служит поверхностно выращенная до обильного спорообразования культура гриба или глубоко выращенный мицелий. На процесс накопления *эндоферментов* мицелиальными грибами при их твердофазном культивировании оказывают следующие влияния: *технологические условия – состав и структура питательной среды, ее влажность, температура в слое, относительная влажность и температура воздушной среды в растительной камере, длительность развития культуры, вид посевного материала*. Твердофазное культивирование микроорганизмов в производстве ведут на сыпучих питательных средах на основе пшеничных отрубей, свекловичного жома, солодовых ростков и т.п. при высоте слоя 25 мм и более.

Подготовка питательной среды состоит в дозировании компонентов, их увлажнении до влажности 35 – 40 %, стерилизации при 120 °С в течение 1 ч, доувлажнении до 55 – 58 %, охлаждении до 40 °С и внесении посевного материала из расчета $7,5 \cdot 10^8$ колоний на 1 кг сухой среды. Эти операции проводят в специальном стерилизаторе. После внесения посевного материала среду перемешивают в течение 40 мин. Засеянная питательная среда влажностью 58 – 60 % раскладывается на перфорированные кюветы слоем 30 мм и более, которые размещаются на стеллажах растительной камеры. В процессе выращивания регулируют температуру, влажность среды и расход стерильного воздуха. Внешний теплообмен микроорганизмов при твердофазном культивировании создается в режиме конвективного движения стерильного воздуха через слой среды методом объемной аэрации. Воздух выполняет роль тепло-хладоагента, изменяет концентрацию углекислого газа в порах среды и камере, снабжает растущую культуру кислородом. Расход воздуха увеличивается пропорционально скорости выделения тепла биомассой и составляет 1 – 25 л/ч на 1 т среды.

В период активного роста мицелий гриба пронизывает весь слой материала, оплетая частицы среды, поэтому в конце культивирования питательная среда имеет вид плотного коржа и называется *поверхностной культурой*. Она содержит 65 – 78 % нерастворимых веществ. Ферменты, находящиеся во внутриклеточном пространстве, из-за небольшого диффузионного сопротивления клеточной стенки мицелия, легко извлекаются из культуры продуцента методом водной экстракции. При экстракции из поверхностной культуры одновременно с ферментами извлекаются другие растворимые вещества, такие, как аминокислоты, низкомолекулярные углеводы, соли, кислоты и т.д., которые можно удалить в процессе осаждения органическими растворителями или высаливанием. Если принять сухие вещества в культуре гриба за 100 %, то при экстракции 22 – 23 % их переходят в раствор, а на долю ферментов приходится 3 – 5 %.

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

Амилаза катализирует реакцию гидролиза крахмала и относится к ферментам группы гидролаз. Под действием α -амилазы из крахмала образуется дисахарид мальтоза, и этот процесс называют *осахариванием крахмала*. Осахаривание лежит в основе приготовления суслу из зерна и картофеля в спиртовом производстве, при изготовлении затора в пивоварении.

В качестве промежуточных продуктов при гидролизе крахмала образуются соединения разного молекулярного веса, называемые *дестринами*. На первых стадиях гидролиза получают дескстрины с высокой степенью полимеризации (35 – 40), с йодом они дают синее окрашивание, как и крахмал. По мере дальнейшего гидролиза молекулярный вес дескстринов снижается и йод окрашивает в фиолетовый, затем темно-бурый, красноватый цвет и, наконец, перестает изменять окраску. Это свойство положено в основу определения количества фермента амилазы в культуре гриба или ферментном препарате. В данной работе активность амилазы определяется по количеству крахмала, расщепленного до неокрашивающихся йодом дескстринов за единицу времени при строго определенных условиях, так как, выделить фермент в чистом виде и определить его количество – очень сложная задача. Удобнее определить количество фермента именно по активности его воздействия на соответствующий субстрат.

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

Занятие 1

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

Порядок выполнения работы

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

Просушить бумажные конверты (16 × 16 см) при 160 °С в течение 3 мин и охладить в эксикаторе. Взвесить пустой пакет, заполнить 5 г отрубей или опилок и взвесить. Распределить материал тонкими слоем и сушить при 160 °С 6 мин, охладить в эксикаторе и взвесить.

Запись в лабораторном журнале:

Масса пустого конверта, г

Масса конверта с влажной навеской, г

Масса конверта с высушенной навеской, г

Масса испаренной влаги (наименование среды), г

Влажность (наименование среды), W , %

Влажность рассчитывают по формуле

$$W = \frac{a - c}{a - n} \cdot 100\%$$

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

Результаты вычислений записывают до второго десятичного знака. Выполнить параллельно два определения влажности пшеничных отрубей и опилок, рассчитать среднюю величину, результаты внести в табл. 4.

4. Результаты определения влажности

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

2. Приготовить 6 вариантов питательной среды по 20 г, отличающихся соотношением пшеничных отрубей и древесных опилок, которые участвуют в разрыхлении среды, и регулировании содержания крахмала, согласно табл. 5.

5. Содержание компонентов, %

Вариант среды	1	2	3	4	5	6
Пшеничные отруби	100	90	80	70	60	50
Древесные опилки	0	10	20	30	40	50

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

Рассчитать количество воды, необходимое для увлажнения среды до 60 % влажности. Уменьшить расход воды на 1 мл, учитывая посевной материал вводимый в виде суспензии конидий. Алгоритм расчета представить в лабораторном журнале, а результаты внести в табл. 6.

Отмерить необходимое количество воды мерным цилиндром, медленно приливая ее к массе, перемешивать для равномерного увлажнения частиц.

Увлажненную массу переносят в коническую колбу. Во избежание загрязнения поверхности горлышка колбы следует использовать металлическую воронку. Колбы закрывают ватной пробкой, бумажным колпачком и стерилизуют 30 мин при 120 °С в автоклаве. Содержимое колбы после стерилизации и охлаждения интенсивно встряхивают.

6. Результаты определения расхода воды для увлажнения среды

Вариант среды	Вариант среды					
	1	2	3	4	5	6
Промежуточные данные расчета						

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

7. Рекомендуемая влажность питательной среды

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

Взвесить навески пшеничных отрубей и древесных опилок по варианту 4 (табл. 5). Рассчитать влажность среды и расход воды до достижения влажности уменьшая его на 1 мл суспензии посевного материала согласно заданию. Алгоритм расчета выполнить в журнале работы, результаты внести в табл. 6, 7. Дальнейшие операции выполнить как в п. 2.

4. Засеять питательную среду суспензией спор гриба.

Для этого в пробирку с культурой гриба на скошенной агаризованной среде заливают стерильную воду до верхнего края косяка. Конидии переводят концом стерильной пипетки во взвешенное состояние и отбирают 1 мл суспензии спор, перенося ее затем в колбу со стерильной средой. После засева среду тщательно перемешивают путем встряхивания и пересыпают в стерильную кювету, потом закрывают ее крышкой. Кювета имеет перфорации для воздухообмена. Операции по засеву среды необходимо производить, соблюдая асептические условия, возле пламени спиртовки.

Кюветы с засеянной средой помещают в термостат. Выращивание длится 48 – 54 ч при температуре 33 °С в течение первых 12 ч роста, а далее поддерживается на уровне 28 – 30 °С.

Занятие 2

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

Порядок выполнения работы

1. Провести экстракцию ферментов из выросшей культуры гриба. Корж тщательно измельчают в кювете с помощью шпателя и на технических весах отвешивают 5 г поверхностной культуры. Шпатель обязательно погрузить в дезинфицирующий раствор. Взвешенную порцию помещают в фарфоровую ступку и тщательно растирают пестиком со 100 мл забуференной дистиллированной воды, которую получают смешивая 10 мл ацетатного буфера (рН 4,7) и 90 мл дистиллированной воды. После чего помещают в термостат на 30 мин при 30 °С. По истечении времени экстракции содержимое фарфоровых ступок переносят на капроновый фильтр и хорошо отжимают для отделения экстракта от биошрота (остатков питательной среды и мицелия).

2. Определить влажность выросшей культуры, сделать запись в журнале работы аналогично п. 1. занятия 1 данной работы.

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

4. Определяют амилолитическую способность (АС) экстракта, используя капельный метод по Климовскому и Родзевич. В основе метода лежит способность фермента амилазы, находящегося в вытяжке, катализировать гидролиз крахмала до не окрашиваемых йодом продуктов.

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

В широкую пробирку заливают 25 мл раствора крахмала. Не вынимая пробирок из термостата, с помощью пипеток добавляют воду, а затем вытяжку от 1 до 25 см³. Общий объем реакционной смеси был 50 см³. Если ферментная вытяжка малоактивна, то можно внести только ее в количестве 25 см³, а воду вообще не добавлять.

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

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

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

Если время гидролиза крахмала менее 10 мин, то определение повторяют, уменьшая объем вытяжки, а увеличивая объем воды. Если гидролиз крахмала не заканчивается в течение 20 мин, то анализ также повторяют, увеличивая объем ферментной вытяжки и уменьшая объем воды. Количество ферментной вытяжки, которое необходимо брать на повторный анализ, вычисляют с учетом полученного времени гидролиза. Например, если ферментная вытяжка имеет малую или слишком высокую активность и количество ферментного раствора от 1 до 25 см³ не обеспечивает длительности гидролиза крахмала в течение 10 – 20 мин, для анализа берут не 25 см³ раствора крахмала, а большее или меньшее его количество, например 10 или 40 см³, внося соответствующую поправку в расчетную формулу (соответственно, 0,1 или 0,4 вместо обычных 0,25 г).

Запись в лабораторном журнале:

Время, за которое произошло расщепление крахмала до неокрашенных йодом продуктов, мин..... _____
Количество ферментного раствора, взятое на анализ, мл _____
Влажность гриба, W , % _____
Амилолитическая активность, ед/г _____

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

$$AC = \frac{0.25 \cdot 60 \cdot 100 \cdot 50 \cdot 100}{T \cdot a \cdot 5 \cdot (100 - W)},$$

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

Форма отчета по лабораторной работе 3

1. Название лабораторной работы.
2. Цель работы.
3. Способ культивирования, название продуцента, наименование фермента, состав среды и ее влажность, время и температура культивирования.
4. Масса поверхностной культуры и ее влажность.
5. Режим экстракции и осветления вытяжки, данные в виде таблицы.
6. Сущность метода определения AC и промежуточные результаты расчетов и исследования.
7. Последовательность выполнения операций на занятиях 1 и 2.
8. Заполнить таблицы 4, 6 и 7.
9. Построить графики зависимостей $AC = f(\text{содержания крахмала})$, $AC = f(W, \%)$.
10. Заполнить сводную табл. 8 и сделать выводы.

8. Результаты исследования

Вариант среды	Состав среды, %		Вода для увлажнения	Влажность культуры, %	AC , ед/г
	Пшеничные отруби	Древесные опилки			

Контрольные вопросы

1. Почему не рекомендуют выращивать в условиях твердофазного культивирования бактерии, дрожжи?
2. Какие параметры технологического процесса влияют на уровень накопления ферментов при твердофазном культивировании микроскопических грибов?
3. Каким методом можно воспользоваться для выделения ферментов из поверхностной культуры?
4. Что представляет собой биошрот?
5. К какому классу ферментов относится амилаза? Какой механизм ее действия?
6. Как определяют количество фермента в исследуемом образце?
7. Какая величина принимается за единицу активности фермента?
8. Как можно влиять на время гидролиза крахмала?
9. Как изменяется окраска реакционной смеси при добавлении раствора йода в течение реакции гидролиза крахмала?

Лабораторная работа 4

ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИКИ РОСТА ДРОЖЖЕЙ ПРИ ГЛУБИННОЙ ФЕРМЕНТАЦИИ

Цель работы: определение основных технологических характеристик периодического процесса глубинной ферментации дрожжей.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Ферментация является определяющей стадией в биотехнологических производствах, в течение которой микроорганизмы растут и размножаются, обеспечивая накопление биомассы продуцента и биологически ценных метаболитов в культуральной жидкости.

Существует два способа культивирования популяции микроорганизмов в глубине жидкой среды: периодический и непрерывный.

При периодическом способе культивирования популяции микроорганизмов проходит шесть фаз размножения: лаг-фазу, переходную фазу I, фазу экспоненциального или ускоренного роста II, фазу замедленного рос-

та III, стационарную фазу IV, фазу отмирания V (рис. 5).

Вид кривой роста дрожжей меняется в зависимости от условий культивирования, но последовательность фаз остается той же.

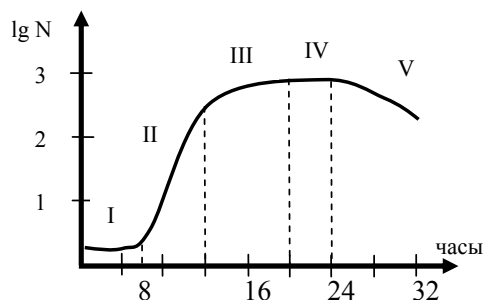


Рис. 5. График накопления числа бактериальных клеток при культивировании на питательных средах

Для количественной характеристики культивирования микроорганизмов пользуются двумя показателями – средней и удельной скоростью роста. Средняя скорость роста V характеризуется приростом биомассы за единицу времени

$$V = \frac{x - x_0}{\tau - \tau_0},$$

где x_0 , x – количество биомассы в начале культивирования, $\text{кг}/\text{м}^3$; x – биомасса за время культивирования, $\text{кг}/\text{м}^3$; τ_0 , τ – начальное и конечное время отсчета, ч.

Удельная скорость роста характеризует часовой прирост на единицу растущей биомассы

$$\mu = \frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{d\tau}.$$

Математическая модель роста количества биомассы – уравнение Моно – применяется для количественного описания динамики роста биомассы

$$\frac{dx}{d\tau} = \mu x.$$

После преобразований это уравнение имеет вид характеризующий прирост биомассы во время экспоненциальной фазы роста.

$$x = x_0 e^{\mu\tau}.$$

Логарифмирование формулы приводит к выражению, которое дает прямую линию в координатах $\ln x - \tau$

$$\ln x = \mu\tau + \ln x_0.$$

Величину μ за определенный промежуток времени можно найти, решив уравнение удельной скорости роста путем логарифмирования

$$\mu = \frac{\ln \frac{x}{x_0}}{\tau - \tau_0} \quad \text{или} \quad \mu = \frac{2,3(\lg x - \lg x_0)}{\tau - \tau_0}.$$

Размерность удельной скорости μ , ч^{-1} . Из приведенных уравнений следует, что удельная скорость роста зависит от количества биомассы засеваемых и получаемых дрожжей, от продолжительности процесса.

Для упрощения расчетов пользуются показателем часового прироста дрожжей, который находится по формуле

$$\alpha = e^{\mu}.$$

Подставив в выражение

$$x = x_0 e^{\mu\tau}$$

получим следующую зависимость

$$x = x_0 \alpha^{\tau}.$$

Таким образом, знание кинетики роста популяции микроорганизмов позволяет установить, как быстро можно достичь максимального количества целевого продукта (биомассы) и оценить это значение.

Продолжительность процесса рассчитывают по формуле

$$\tau = \frac{\ln \frac{x}{x_0}}{\mu}.$$

В технологических расчетах учитывают часто величину выхода биомассы – экономический коэффициент Y , равный отношению выращенной биомассы к потребленному субстрату

$$Y = \frac{x \cdot 100}{S - S_0},$$

где x – количество биомассы; S_0, S – начальная и конечная концентрация питательных веществ, $\text{кг}/\text{м}^3$.

Следует отметить, что варьируя значениями показателей – x_0 и τ , можно подобрать наиболее оптимальное их соотношение для технологического процесса, обеспечивающее максимально возможный выход биомассы дрожжей.

Для изучения кинетики роста микробной популяции в условиях глубокой ферментации используют дрожжи рода *Saccharomyces*. Экспериментальные данные для определения технологических показателей процесса культивирования получают на лабораторной установке (рис. 6).

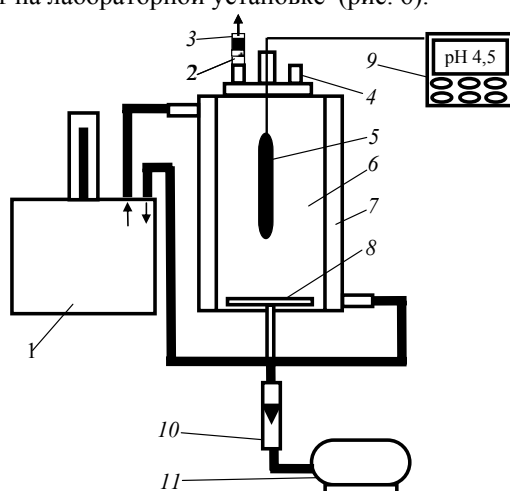


Рис. 6. Схема лабораторной установки для выращивания дрожжей:

1 – ультрагерметизированный резервуар; 2 – фильтр очистки воздуха; 3 – штуцер выхода воздуха; 4 – штуцер ввода среды и отбора проб; 5 – электрод pH – метра; 6 – емкость культиватора; 7 – рубашка; 8 – барботер; 9 – иономер; 10 – ротаметр; 11 – компрессор

Установка состоит из емкости объемом 1 л для выращивания дрожжей 6, снабженной барботером 8 для равномерного распределения воздуха, нагнетаемого компрессором 11. Отработанный воздух очищается, проходя систему фильтров 2. Емкость культиватора снабжена рубашкой 7, в которую подается вода от ультрагерметизированного резервуара 1 для поддержания температуры процесса выращивания. Уровень pH и температура среды измеряется электродом 5 ионометра 9. Расход воздуха, усугубляется ротаметром 10.

Порядок выполнения работы

1. Приготовить 1 л питательной среды, следующего состава: сахар – 9 %; диаммоний фосфат – 0,3 %; аммоний серноокислый – 0,16 %; хлористый калий – 0,06 %; магний серноокислый – 0,02 %. Замерить величину pH раствора на иономере и довести при необходимости до 4,5 70 %-ной ортофосфорной кислотой или аммиачной водой.

2. Произвести асептическую обработку емкости культиватора этанолом. После чего заполнить его питательной средой, отобрав в пробирку 15 мл исходной смеси для определения в ней содержания сахара.

3. Включить ультрагерметизированный резервуар и нагреть питательный раствор до температуры 30–31 °С. После чего через штуцер 8 ввести через воронку суспензию засеваемых: дрожжей (посевного материала) в количестве 12 % к объему питательной среды. Температура среды в течение процесса, также как и pH среда контролируется с помощью ионометра, электрод которого постоянно находится в жидкости.

4. Включить компрессор 3 и установить расход воздуха равный из расчета 5 – 10 $\text{м}^3/\text{м}^3\text{ч}$ с помощью ротаметра 10. Отработанный воздух удаляется через штуцер 3, снабженный фильтром 2 из активированного угля и стекловаты для задержки капель среды и клеток дрожжей.

5. Отсчет времени культивирования следует начинать с момента внесения в питательную среду засеваемых дрожжей. Первую пробу для определения начальной концентрации дрожжевых клеток x_0 отбирают в количестве 1 мл стерильной пипеткой через штуцер 4 через 1 – 3 мин после начала процесса. Затем отбор проб производят через каждый час для определения x_n – количества выросшей биомассы.

6. Провести подсчет количества дрожжевых клеток, используя камеру Горяева, результаты внести в табл. 9. Для подсчета дрожжей небольшую каплю питательной среды с биомассой клеток отобрать пипеткой или стеклянной палочкой, нанести ее на поверхность счетной камеры и накрыть шлифовальным стеклом, и притереть покровное стекло к сторонам камеры до появления радужных колец. Камеру поместить на предметный столик и с объективом 8× найти изображение сетки, а затем заменить объектив на 40×. Вести подсчет через 3 – 5 мин от момента заполнения. Подсчитать количество клеток в 10 больших или 20 малых квадратах сетки, расположенных по диагонали. Учесть все клетки, лежащие в квадратике сетки и пересекающие верхнюю и правую стороны квадрата. Определить среднее число N_{cp} дрожжей в квадрате (табл. 10). Число дрожжей в одном квадрате не должно быть более 20, в противном случае исходную суспензию разбавляют и повторяют расчет.

Количество клеток в 1 мл суспензии вычислить по формуле

$$x = \frac{N_{\text{cp}} \cdot 1000}{hS},$$

где N_{cp} – среднее число дрожжей в квадрате, шт; h – глубина камеры; S – площадь квадрата сетки, мм (площадь большого квадрата 1/25 мм², малого – 1/400 мм²).

9. Результаты подсчеты дрожжевых клеток

Час роста	Количество клеток в одном квадрате сетки, шт.					Среднее число клеток, шт	Количество клеток в 1 мл
	1	2	3	4	5		

Одновременно зафиксировать в табл. 10 значения рН среды и температуры по показаниям шкалы ионометра.

7. В каждой пробе, начиная с исходного момента культивирования, определить содержание сахара в среде, как основного углеродосодержащего субстрата, для этого рекомендуется использовать йодометрический метод определения сахара в биологических объектах, а также замеряют количество усвояемого (растворенного) азота.

Количество усвояемого азота определяют **формальным титрованием**. 10 мл бражки разбавляют 90 мл дистиллированной воды и титруют 0,1 н раствором гидроксида натрия с фенолфталеином до слабо-розового окрашивания. Затем туда же приливают 5 мл нейтрального 40 %-ного формалина и титруют вторично тем же раствором NaOH опять до слабо-розового окрашивания.

Число миллилитров 0,1 н раствора NaOH, пошедшее на вторичное титрование, характеризует формальное число испытуемой жидкости. Эта величина относительная и показывает количество растворенного в среде аммонийного и аминного азота.

Запись в лабораторном журнале

Объем реакционной смеси на титрование, мл _____
 Количество 0,1 н раствора NaOH на первое титрование, мл _____
 Количество 0,1 н раствора NaOH на второе титрование, мл _____

Основой **йодометрического метода** является **способность редуцирующих сахаров** (глюкозы и мальтозы) окисляться йодом до соответствующих кислот. Определению предшествует холостой опыт, в котором определяется соотношение между приготовленными 0,1 н растворами йода (25,0 см³) и тиосульфата натрия. Его проводят, как указано ниже, только вместо 10 см³ разбавленного основного раствора в коническую колбу отмеривают 10 см³ дистиллированной воды.

- Основной раствор содержащий сахарозу разбавляют в 10 раз. Для этого в мерную колбу вместимостью 100 см³ отмеривают пипеткой 10 см³ основного раствора, объем раствора доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают.

- 10 см³ полученного раствора пипеткой переносят в коническую колбу вместимостью 250 – 400 см³, туда же отмеривают пипеткой 25,0 см³ 0,1 н раствора йода и медленно приливают из бюретки 30,0 см³ 0,1 н раствора гидроксида натрия. Содержимое колбы тщательно перемешивают, накрывают колбу часовым стеклом или закрывают пробкой и ставят в темное место на 15 – 20 мин. Затем вносят 4,5 – 5 см³ 1 н раствора серной кислоты и титруют 0,1 н раствором тиосульфата натрия до светло-желтого окрашивания, в конце добавляют 1 см³ раствора крахмала и продолжают титрование до обесцвечивания.

Массовая доля редуцирующих веществ в пересчете на сухое вещество (%) определяют по формуле

$$P_{\text{в}} = \frac{(V_0 - V)9K \cdot 100 \cdot 100}{200c},$$

где V_0 – объем 0,1н раствора тиосульфата натрия, израсходованного на титрование 25 см³ 0,1 н раствора йода в холостом опыте, см³; V – объем 0,1н раствора тиосульфата натрия, израсходованного на титрование при анализе, см³; 9 – масса глюкозы, соответствующая 1 см³ 0,1н раствора тиосульфата натрия, мг; K – поправочный коэффициент к нормальности раствора тиосульфата натрия; 200 – масса сахарозы, содержащаяся в 10 см³ разбавленного основного раствора, мг; c – массовая доля сухих веществ сахарозы, %.

Запись в лабораторном журнале

Объем тиосульфата в холостом опыте V_0 , мл _____
 Объем тиосульфата при анализе бражки, V_1 , мл _____
 Доля редуцирующих веществ в пересчете на сухое вещество, %, _____

По ходу лабораторной работы заносить данные в табл. 10.

Составить протокол работы согласно форме.

Форма отчета по лабораторной работе 4

1. Название и цель лабораторной работы.
2. Схема лабораторной остановки с кратким описанием принципа ее работы.
3. Краткое описание используемых в работе методов анализа концентрации биомассы дрожжей, углерод-

содержащего субстрата, усвояемого азота и формул для их расчета.

4. Заполнить табл. 9, 10 и проанализировать их данные.

5. Построить графическую зависимость концентрации биомассы дрожжевых клеток во времени, а также изменение концентрации сахара и усвояемого азота.

11. Технологические характеристики роста дрожжей в условиях глубинной ферментации при периодическом культивировании

Время отбора пробы, ч	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Концентрация дрожжевых клеток x , млн кл/мл										
pH среды										
Температура среды, °C										
Концентрация сахара, S_c , %										
Количество растворенного азота в среде										

Контрольные вопросы

1. Назовите основные отличия периодического и непрерывного культивирования.
2. Какие фазы размножения проходит биомасса клеток в условиях периодического культивирования?
3. Какие показатели используют для характеристики процессов роста популяции микроорганизмов?
4. В каких единицах измеряется удельная скорость роста, общая скорость роста?
5. Какие можно изменить удельную скорость роста.
6. С помощью какого устройства регулируется температура процесса?
7. Какова доза посевного материала?
8. В чем сущность метода определения углеродосодержащего субстрата в работе?
9. Какой метод используется для определения концентрации биомассы?
10. Рассчитайте, какое количество биомассы будет накоплено к десятому часу роста, используя определенную Вами среднюю удельную скорость роста.

Лабораторная работа 5

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФИЛЬТРАЦИИ ВОЗДУХА

Цель работы: выявление закономерностей эффективной работы элементов системы тонкой очистки воздуха.

Методические рекомендации

В пищевых и биотехнологических производствах зараженность воздуха микроорганизмами оказывает существенное влияние на показатели качества продукции и течение технологических операций, приводит к снижению нормативных сроков хранения, а также вызывает различные заболевания человека. Воздух производственных помещений считается чистым, если в нем содержится не более 500 микроорганизмов в 1 м^3 . Средняя общая концентрация микроорганизмов в атмосферном воздухе достигает 2000 клеток/ м^3 . Воздух может содержать мельчайшие твердые и жидкие частицы, несущие различные микроорганизмы, размером от 0,1 мкм до десятков микрометров. В воздухе также могут присутствовать вирусы и фаги. Воздух не является благоприятной средой для развития многих видов микроорганизмов из-за отсутствия в нем капельно-жидкой влаги. Численный и видовой состав микрофлоры воздуха существенно изменяется в зависимости от географических и климатических особенностей региона, времени года, метеорологических условий, санитарного состояния местности и ряда других факторов. В воздухе находятся обычно микрококки, сарцины, различные спороносные и бесспорные бактерии, дрожжи, споры грибов.

Необходимость очистки и стерилизации воздуха возникает не только при обеспечении аэрации, но и при очистке воздушных выбросов из технологического оборудования и производственных помещений, вентиляции боксов, в которых необходимо поддерживать повышенный уровень чистоты для проведения технологических процессов в асептических условиях.

Очистка воздуха достигается удалением взвешенных частиц механическими методами – воздействием центробежной силы в циклонах; инерции в отделителях; промывкой в срубберах, пенных аппаратах; в электрофильтрах. Фильтрация через слой насыпного, пористого или волокнистого материала, является универсальным способом тонкой очистки от микроорганизмов. Это происходит в результате воздействия различных сил и объясняется несколькими механизмами, основанных на явлениях инерции движущихся частиц, осаждении под действием силы тяжести, диффузии, электростатического взаимодействия, захвата при касании поверхности, ситового эффекта.

Влияние инерционных сил проявляется при удалении частиц диаметром 1 – 3 мкм. При определенной массе и скорости частицы стремятся сохранить прямолинейное движение и не следуют за воздушным потоком, а

приближаются к преграде и осаждаются (рис. 7).

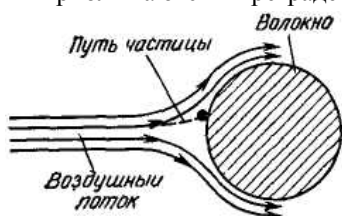


Рис. 7. Схема осаждения частиц под действием сил инерции

Для частиц диаметром 1 – 10 мкм осаждение происходит в ламинарном режиме под действием сил тяжести и подчиняется закону Стокса.

Диффузионный эффект за счет броуновского движения в результате которого частицы могут проходить путь соизмеримый с расстоянием между волокнами фильтрующего материала, и проявляется для частиц диаметром менее 1 мкм.

Осаждение под действием электростатических сил возможно в двух случаях. Во-первых, когда частицы начинают движение, уже имея заряд, противоположный заряду на поверхности волокна, и во-вторых, когда заряжено только волокно и противоположный заряд приобретает частицами через индукцию. Изучение знака зарядов, переносимых сухими спорами некоторых микроорганизмов, показало, что 75 % спор имеют отрицательный заряд, 15 % – положительный и 10 % – нейтральный. Эффект электростатического осаждения усиливается тем, что прохождение сухого воздуха вызывает образование сильных зарядов на многих видах стеклянных и синтетических волокон.

После того как аэрозольная частица под действием силы инерции, силы тяжести, диффузии или электрического взаимодействия приблизится к поверхности фильтрующего материала на расстояние, соизмеримое с ее диаметром, происходит касание этой поверхности и захват (прилипание) частицы. После этого частицы, как правило, очень прочно удерживаются на поверхности фильтрующего материала под действием различных сил, например ван-дер-ваальсовых. Эффект непосредственного касания частицей поверхности может проявиться и вне связи с другими механизмами осаждения, когда частица случайно попадает в зону потока, примыкающую к поверхности фильтрующего материала (рис. 8), где d_c – диаметр частицы, d_b – диаметр волокна.



Рис. 8. Схема улавливания частиц путем касания

Все перечисленные механизмы действуют одновременно и в зависимости от условия скорости потока, диаметра и плотности частиц, типа фильтрующего материала и др., один или несколько из них являются доминирующими. Роль седиментационного, диффузионного и электростатического эффектов возрастает с уменьшением скорости воздушного потока, а роль инерционного эффекта уменьшается.

Ситовый метод задержки частиц проявляется, когда размер частицы превышает расстояние между волокнами или гранулами фильтрующего материала. Для большинства фильтров тонкой очистки этот механизм приводит к задержке лишь крупных частиц диаметром несколько десятков микрон. При необходимости более надежной, гарантированной стерилизации воздуха используются фильтрующие материалы с калиброванными отверстиями размером 0,1 – 0,5 мкм, задерживающие частицы

только благодаря ситовому эффекту.

Эффективность стерилизации при фильтровании оценивается по коэффициенту проскока

$$K_{\text{п}} = \frac{X}{X_0} \cdot 100,$$

где X – концентрация микроорганизмов в воздухе после системы очистки, кл/м³; X_0 – концентрация микроорганизмов в воздухе до системы очистки, кл/м³.

Коэффициент проскока для ферментаторов должен быть не более 10⁻⁸ – 10⁻¹¹ %. Величина коэффициента проскока зависит от скорости воздушного потока, размера частиц и носит экстремальный характер (рис. 9).

Установлено, что наиболее проникающие частицы при обычно применяемых скоростях фильтрации имеют диаметр порядка 0,01 – 0,1 мкм.

Математическая модель осаждения частиц аэрозоля при фильтровании имеет вид

$$\ln \frac{X}{X_0} = V_{\text{ф}} H,$$

где H – глубина фильтра, м; $V_{\text{ф}}$ – константа фильтрации, м⁻¹.

Константа фильтрации зависит от размеров и плотности частиц аэрозоля, диаметра волокна и плотности его упаковки, скорости воздуха, влажности, температуры. Иногда константу фильтрации выражают через толщину фильтрующего слоя H_{90} , необходимого для улавливания 90 % частиц от их начального содержания

$$\ln \frac{X_0}{0,1 \cdot X_0} = V_{\text{ф}} H_{90}; V_{\text{ф}} = \frac{2,3}{H_{90}}.$$

Константу фильтрации определяют экспериментально и рассчитывают глубину фильтра при заданном коэффициенте проскока.

На практике для определения общей обсемененности воздуха до очистки используют седиментационный и аспирационный методы.

Для ориентировочного и сравнительного определения загрязненности воздуха наиболее прост седиментационный метод, при котором учитывается общее количество микроорганизмов, осевших на агаровую пластинку открытой чашки Петри за единицу времени. Чашки оставляют открытыми 5, 10 или 15 мин (время экспозиции) в зависимости от загрязнения воздуха

Для расчета пользуется формулой, предложенной В.Л. Омелянским, согласно которой на поверхность чаши в 100 см² оседает в течение 5 мин столько организмов, сколько их содержится в 10 л воздуха.

Общее количество микроорганизмов в 1 м³ воздуха при седиментационном методе

$$x_{\text{сед}} = \frac{a \cdot 100 \cdot 5 \cdot 100}{S \tau}$$

где a – среднее количество колоний в чашке, шт; τ – время экспозиции, мин; S – площадь чашки Петри, см^2 ; 100 – пересчет площади чашки Петри на 100 см^2 ; 5 – экспозиция чашки по Омелянскому, мин; 100 – пересчет на 1 м^3 .

Более точное содержание микроорганизмов в 1 м^3 воздуха определяют аспирационным методом с помощью прибора Ю.А. Кротова (рис. 10).

Вентилятор вращается с частотой $4000 - 5000 \text{ мин}^{-1}$, засасывает воздух, который поступает через клиновидную щель аппарата и ударяется о поверхность питательной среды в чаше Петри. Обтекая электродвигатель, воздух выходит из прибора через ротаметр, градуированный в л/мин. Для равномерного распределения микроорганизмов по поверхности среды диск с чашкой Петри также вращается, но с частотой $60 - 100 \text{ об/мин}$. В течение 1 мин через аппарат проходит $25 - 50 \text{ л}$ воздуха. Для определения общей обсемененности воздуха аппарат включают на 1 – 3 мин, при установлении санитарного состояния и выявления патогенных микроорганизмов – на 3 – 15 мин.

Содержание микроорганизмов в 1 м^3 рассчитывают по формуле

$$x_{\text{АСП}} = \frac{a \cdot 1000}{\tau V_{\text{в}}},$$

где a – количество колоний в чашке, шт; τ – время, в течение которого происходил контакт с воздухом, мин; $V_{\text{в}}$ – объем воздуха из которого происходило оседание микроорганизмов за 1 мин, л; 1000 – переводной коэффициент из литров в м^3 .

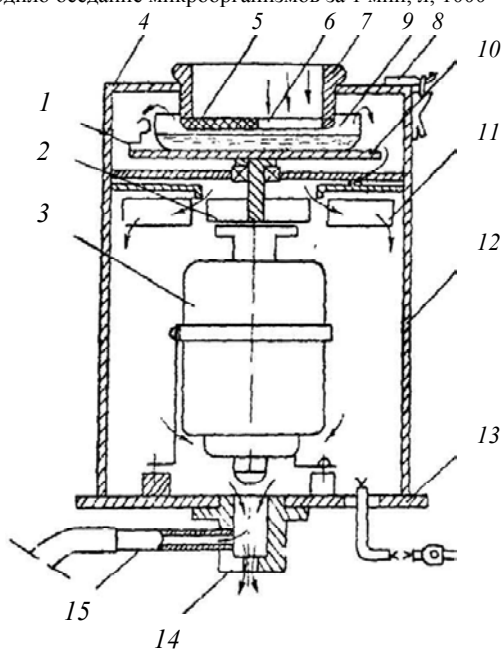


Рис. 10. Схема аппарата Ю.А. Кротова:

- 1 – электродвигатель;
- 2 – крыльчатка;
- 3 – пружина;
- 4 – крышка прибора;
- 5 – диск из плексигласа;
- 6 – клиновидная щель;
- 7 – разрезное кольцо;
- 8 – накладные замки;
- 9 – чашки Петри;
- 10 – диск;
- 11 – центробежный вентилятор;
- 12 – цилиндр;
- 13 – основание цилиндра;
- 14 – штуцер с диафрагмой;
- 15 – выводная трубка

Порядок проведения работы

Лабораторная работа проводится на двух занятиях.

Занятие 1

1. Произвести отбор проб воздуха седиментационным и аспирационным методом для определения содержания в нем микроорганизмов. С этой целью взять две чашки Петри с МПА, подписать их. Одну чашку раскрывают, сдвигая крышку на самый край бортика так, чтобы вся поверхность агаризованной среды была полностью открыта. Чашку оставляют открытой 5 мин. Затем закрывают ее крышкой, переворачивают вверх дном и помещают в термостат при $37 \text{ }^\circ\text{C}$ на 24 – 48 ч. Вторую чашку Петри без крышки закрепляют на диске прибора Кротова, установить скорость прокачивания воздуха 25 л/мин и отметить начальное время аспирации. Включают прибор и произвести забор 100 л воздуха. Чашу также помещают в термостат для инкубации в течение 24 – 48 ч при $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Одной подгруппе следует отобрать шесть проб воздуха (по три каждым способом).

2. Произвести очистку воздуха чрез воздушный фильтр и определить коэффициент проскока. С этой целью собрать экспериментальную установку согласно схеме 11.

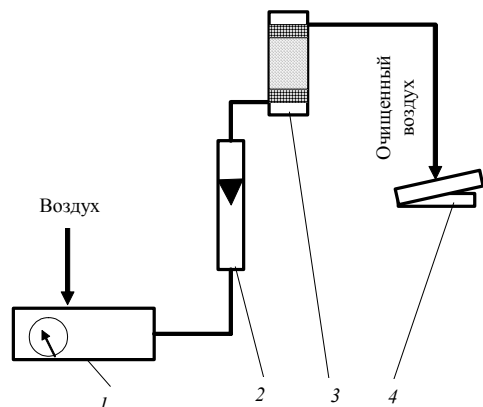


Рис. 11. Схема лабораторной установки:

1 – компрессор, с регулированием расхода воздуха; 2 – ротаметр; 3 – фильтр; 4 – чашки Петри с МПА

Перед началом отбора проб воздуха следует путем прямых замеров с помощью штангенциркуля определить геометрические размеры слоя фильтрующего материала в воздушном фильтре 3, внутренний диаметр шланга, и с помощью ротаметра 2 при включении компрессора 1 – расход воздуха.

Включить компрессор 1, установить расход по ротаметру 2 (пользуясь табл. 11) и направить струю очищенного воздуха на поверхность пластины МПА в приоткрытую чашку Петри. Выходное отверстие шланга следует расположить между двумя работающими горелками.

Запись в лабораторном журнале:

Высота слоя фильтрующего материала, H , см _____
 Диаметр фильтра, $D_{\text{ф}}$, см _____
 Тип фильтрующего материала _____
 Внутренний диаметр воздушного шланга, $D_{\text{ш}}$, мм _____
 Расход воздуха по ротаметру, Q , л/ч _____

11. Режимы работы установки

Вариант	1	2	3	4	5
Число делений на ротаметре	100	80	60	40	20
Расход воздуха, л/мин	1,05	0,84	0,63	0,42	0,21
Время контакта, мин	4	5	7	10	20

Засеянные чашки Петри поместить в термостат для инкубации на 24 – 48 ч.

Занятие 2

На втором занятии следует произвести анализ посевов и рассчитать ряд показателей характеризующих изучаемый процесс воздухоочистки.

1. Произвести подсчет количества колоний в чашках, вычислить площадь питательной среды в чашке и рассчитать общее количество микроорганизмов по соответствующим формулам, данному методу, заполнить табл. 12.

12. Результаты анализа общей обсемененности

Метод отбора	Номер пробы	Время контакта с воздухом, мин	Объем контактирующего воздуха, л	Количество колоний, шт	Площадь агаровой пластины, см^2	Количество микроорганизмов в 1 м^3	Среднее количество микроорганизмов в 1 м^3
седиментационный	1						
	2						
	3						
аспирационный	1						
	2						
	3						

2. Заполнить итоговую табл. 13. Скорость воздушного потока $V_{\text{вп}}$ рассчитать для пяти вариантов расхода воздуха по формуле

$$V_{\text{вп}} = \frac{4Q_i}{\pi D^2},$$

где Q_i – расход воздуха, м³/с; D – диаметр отверстия шланга, м.

13. Результаты лабораторной работы

Время контакта, мин	Расход воздуха, Q_i , м ³ /с	Скорость воздушного потока $V_{\text{вп}}$, м/с	Количество микроорганизмов после очистки, x , кл/м ³	Количество микроорганизмов до очистки, x_0 , кл/м ³	$\ln \frac{x}{x_0}$	Коэффициент проскока, K , %	Глубина фильтра, H , м	Коэффициент фильтрации, $V_{\text{ф}}$, м ¹

Выполнить графическую зависимость $K_{\text{п}} = f(V_{\text{в}})$. Рассчитать толщину фильтрующего слоя H_{90} , необходимого для улавливания 90 % частиц от их начального содержания x_0 по формуле

$$\ln \frac{x_0}{0,1x} = V_{\text{ф}} H_{90}.$$

Сделать выводы по результатам лабораторной работы.

Форма отчета по лабораторной работе 5

1. Название лабораторной работы.
2. Цель работы.
3. Методы определения микробной обсемененности воздуха и формулы для их расчета
4. Схема лабораторной установки и краткое описание эксперимента, проводимого на ней.
5. Формулы для расчета, результаты эксперимента в виде табл. 12, 13, расчет толщины фильтрующего слоя.
6. Построить графическую зависимость $K_{\text{п}} = f(V_{\text{в}})$.
7. Выводы по результатам лабораторной работы.

Контрольные вопросы

1. В чем заключается отрицательное влияние загрязненного микроорганизмами воздуха?
2. Какие методы используют для анализа микрофлоры воздуха?
3. Какие группы микроорганизмов преобладают в воздухе?
4. Какие среды используют для количественного учета микроорганизмов в воздухе?
5. Какие методы используются на практике для очистки воздуха, и при каких условиях их действие наиболее эффективно?
6. Какой метод позволяет добиться стерильности воздуха?
7. По какому показателю оценивают эффективность стерилизации воздуха? Какова его величина и от чего он зависит?
8. Какие факторы учитывает математическая модель фильтрования аэрозоля?
9. Как достигается равномерное распределение микроорганизмов на поверхности среды в приборе Кротова?
10. Почему в формуле предложенной В.Л. Омелянским в знаменателе используется время экспозиции?
11. Каков принцип работы лабораторной установки?
12. Какие данные получают экспериментальным и расчетным путем при выполнении лабораторной работы?
13. Каким образом изменяют расход воздуха на лабораторной установке и в приборе Кротова?
14. О чем можно судить по величине H_{90} ?
15. Какой характер имеет зависимость коэффициента проскока от скорости воздушного потока?

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССА КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ ДРОЖЖЕЙ МЕТОДОМ ПЕННОЙ ФЛОТАЦИИ

Цель работы: изучить принцип действия напорного флотатора и определить характер зависимости коэффициента флотирования от времени отстаивания пены.

Общие сведения о процессе флотации

В производстве кормовых дрожжей и для очистки сточных вод широкое применение имеет флотация. Наряду с сепарированием, центрифугированием, отстаиванием, фильтрацией, она отнесена к механическим способам концентрирования биомассы дрожжей.

В основе флотации лежит процесс избирательного смачивания. Основные виды флотации – пенная, масляная и пленочная. Наибольшее распространение получила пенная флотация, которая заключается в следующем: культуральную жидкость с биомассой микроорганизмов непрерывно вспенивают воздухом, подаваемым снизу вверх под давлением. Клетки и их агломераты «прилипают» к пузырькам тонкодиспергированного воздуха и всплывают вместе с ними, собираясь в специальной отстойнике. Использование метода флотирования обеспечивает надежность непрерывного выделения дрожжей из культуральной жидкости, сокращает число сепараторов и, соответственно, эксплуатационные расходы. Дрожжи, получаемые этим методом, имеют более высокие качественные показатели по содержанию белка, зольности, по вкусу и цвету.

На эффективность процесса пенной флотации оказывают влияние следующие факторы:

1. Структура пены и способ ее образования: чем мельче ячейки пены, тем больше поверхность раздела фаз и, следовательно, количество дрожжевых клеток, которое может быть сорбировано. Разрушение мелкоячеистой пены, всплывающей в верхние слои, приводит к образованию более крупных пузырьков, при этом поверхность раздела фаз резко сокращается. Вследствие этого возрастает степень адсорбционного насыщения пены дрожжами, а в жидкости, образовавшейся из пены, появляется повышенное количество дрожжей.

Увеличение газа в пене уменьшает содержание в ней жидкости и наблюдается при этом почти прямолинейная зависимость.

2. Величина потерь дрожжей с отработанной культуральной жидкостью увеличивается с ростом концентрации их в исходной культуральной жидкости.

3. Концентрация дрожжей в пенном слое возрастает прямо пропорционально времени отстаивания пены. Кроме того, скорость концентрирования дрожжей в пене зависит от соотношения площади поверхности отстаивания и объема расслаиваемой пены.

4. Извлечение дрожжей из культуральной жидкости так же, как и концентрирование их в пене, зависит от продолжительности процесса и количества воздуха, подаваемого во флотатор. Оптимальная скорость продувки воздуха во флотаторе составляет 2,3 – 2,5 м³/мин на 1 м³ дрожжевой суспензии. Чем больше время пребывания жидкости во флотаторе, тем больше концентрация дрожжей в пене.

Описание лабораторной установки

Лабораторная установка (рис. 12) включает напорный флотатор ФЛ, который имеет цилиндрическую обечайку, механическую мешалку для усиления пенообразования, газораспределительное устройство для нагнетания воздуха в культуральную жидкость и внутренний стакан, являющийся одновременно сборной емкостью и местом гашения пены. Воздух во флотатор подается воздуходувкой ВД, а расход устанавливается с помощью ротометра РТ. Исходная суспензия из емкости Е₁ перистальтическим насосом Н₁ направляется во флотатор. Концентрированная суспензия самотеком отводится из конической части стакана в емкость Е₂. Отработанная жидкость насосом Н₂ по циркуляционному контуру возвращается в емкость Е₁.

Порядок выполнения лабораторной работы

Работа заключается в определении концентрации биомассы в сгущенной дрожжевой суспензии, полученной методом напорной флотации при изменяющейся продолжительности времени отстаивания пены с последующим расчетом коэффициента флотации.

Для выполнения работы необходимо следующее оборудование: лабораторная установка, электроплитка, мерные цилиндры на 100, 250, 500 и 1000 мл, технические весы, компрессор, рН-метр, центрифуга настольная, стеклянные мензурки на 500 мл (2 шт.), химические стаканы на 250 или 500 мл (2 шт.), стеклянная палочка, секундомер.

Группа разбивается на шесть бригад, каждая из которых проводит исследование при одном из режимов отстаивания.

Исследования проводят с суспензией дрожжей в следующей последовательности.

1. Определяют центрифугированием концентрацию биомассы клеток в исходной суспензии, величину рН устанавливают на потенциометре.

Для определения концентрации биомассы с помощью мерного цилиндра отмеряют 100 мл дрожжевой суспензии и переносят в центрифужный стаканчик, предварительно взвешенный на технических весах с точностью до десятых долей грамма. С целью разделения дрожжевых клеток от жидкой среды проводят центрифугирование при режиме 3 тыс. об/мин в течение 5 мин. После чего надосадочную жидкость (фугат) осторожно сливают, а центрифужный стаканчик взвешивают. По разности массы стаканчика с осадком и пустого стаканчика определяют количество биомассы влажных дрожжей в 100 мл, производя затем пересчет на 1 л

$$C = (B_2 - B_1) \times 10,$$

где V_1 – масса пустого центрифужного стаканчика, г; V_2 – масса центрифужного стаканчика с осадком, г.

Данные заносят в протокол наблюдений табл. 14.

2. Мерным цилиндром на 1 л отмеряют 2,5 л дрожжевой суспензии и переносят в емкость E1 после чего следует включить компрессор К, который будет через барботажное устройство поддерживать биомассу во взвешенном состоянии. Включить насос Н1 и передать суспензию из емкости E1 во флотатор. После чего насос отключить. Еще раз отмерить 2,5 л суспензии и перенести ее вновь в емкость E1.

3. Включить воздуходувку, установив регулировочным вентилем расход воздуха по ротаметру на отметке 10, что соответствует 2,5 объемом воздуха на 1 объем суспензии в минуту.

4. Включить механическую мешалку 2.

С момента первого поступления пены в стакан-сборник 4 один из членов бригады включает насос Н1 на режим 1 (это соответствует 60 делениям регулировочного тумблера). Скорость потока жидкости при этом составляет 0,5 л/мин. Другой студент засекает время по секундомеру

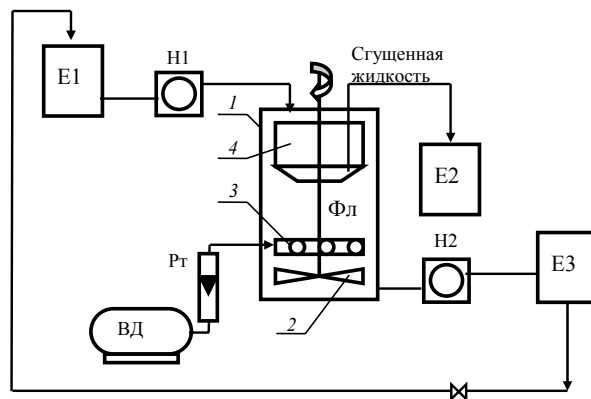


Рис. 12. Схема лабораторной установки для изучения процесса напорной флотации:

1 – цилиндрическая обечайка; 2 – механическая мешалка; 3 – барботер; 4 – внутренний приемный стакан; E1 – емкость для исходной суспензии; E2 и E3 – емкости для сбора, соответственно, осветленной и отобранной жидкости; ФЛ – флотатор; РТ – ротаметр; ВД – воздуходувка; Н1 и Н2 – насосы

ру и включает насос Н2, откачивающий отработанную жидкость из нижней части флотатора в емкость E2 для сбора осветленной жидкости. Сгущенную суспензию отбирают через отвод в химический стакан в течение времени, которое определено преподавателем в соответствии с режимом протока.

5. Проводят дегазацию суспензии путем подогревания отобранной пробы на электроплитке до состояния обезпенивания. После чего мерным цилиндром замеряют объем жидкости. Данные вносят в табл. 15 протокола наблюдений.

6. Отбирают пробу сгущенной суспензии мерным цилиндром и определяют в ней концентрацию клеток согласно описания п. 1.

7. Каждая бригада проводит исследования в указанном порядке для одного режима, занося полученные данные в табл. 15.

Протокол исследования

14. РЕЗУЛЬТАТЫ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ

Номер опыта	0	1	2	3	4	5	6
Вес пустого стаканчика, г							
Вес стаканчика с осадком, г							

15. ДАННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОЦЕССА НАПОРНОЙ ФЛОТАЦИИ

Номер опыта	1	2	3	4	5	6
Концентрация дрожжей в исходной суспензии, x_0 г/л						
Объем сгущенной суспензии, V_{cc} , л						
Концентрация дрожжей в сгущ. суспензии, x_{cc} г/л						
Коэффициент флотации, $K_{фл} = x_{cc}/x_0$						

Форма отчета по лабораторной работе 6

1. Название и цель работы.

