

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Южно-Уральский государственный университет  
Кафедра «Пищевые и биотехнологии»

664(07)

К172

И.В. Калинина, Р.И. Фаткуллин, И.Ю. Потороко

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ  
ПРОИЗВОДСТВА ПИЩЕВЫХ  
ИНГРЕДИЕНТОВ**

Учебное пособие

Челябинск  
Издательский центр ЮУрГУ  
2024

УДК 664(075.8)+577.23(075.8)  
К172

Одобрено  
учебно-методической комиссией  
Высшей медико-биологической школы

Калинина И.В., Фаткуллин Р.И., Потороко И.Ю.  
К172 Биотехнологические основы производства пищевых  
ингредиентов / И.В. Калинина, Р.И. Фаткуллин, И.Ю. Потороко  
– Челябинск: Издательский центр ЮУрГУ, 2019. – 160 с.

Учебное пособие предназначено для студентов высших учебных заведений, обучающихся по направлению бакалавриата 19.03.01 «Биотехнология».

Материал учебного пособия соответствует содержанию образовательной программы направления подготовки 19.03.01 «Биотехнология».

УДК 664(075.8)+577.23(075.8)

© Издательский центр ЮУрГУ, 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>Введение</b> .....	4
<b>Глава 1. Общие сведения о технологии биосинтеза пищевых ингредиентов с использованием микроорганизмов</b> .....	5
1.1. Общая характеристика пищевых ингредиентов.....	5
1.2. Основы процесса биосинтеза .....	7
1.3. Инновационные подходы интенсификации биотехнологических процессов .....	9
<b>Глава 2. Лабораторно-практические занятия по дисциплине «Биотехнологические основы производства пищевых ингредиентов»</b> .....	13
2.1. Биотехнология получения пищевых ингредиентов с использованием дрожжей.....	13
2.2. Биотехнология получения пищевых ингредиентов с использованием молочнокислых микроорганизмов.....	34
2.3. Ферментативный биосинтез .....	38
<b>БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК</b> .....	45
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ</b> .....	48

## ВВЕДЕНИЕ

В целях получения пищевых ингредиентов, таких как органические кислоты, спирты, витамины, ферменты, белки, аминокислоты, пигменты, полиненасыщенные жирные кислоты и другие в последние годы все более активно используют технологии биосинтеза. Достижения в области лабораторных методов отбора нетоксичных штаммов микроорганизмов, а также возросшие знания о регуляции биосинтеза и возможностях генной инженерии позволили достичь более высоких выходов безопасных пищевых ингредиентов.

Биосинтез – это многостадийный, катализируемый ферментами биотехнологический процесс, в котором простые соединения превращаются или соединяются вместе, образуя макромолекулы или более сложные продукты. Процесс биосинтеза осуществляется в результате жизнедеятельности микроорганизмов. Такой подход к синтезу натуральных ингредиентов микроорганизмами имеет много преимуществ, среди которых такие как минимизация химического воздействия, возможность крупномасштабного производства, экономическая жизнеспособность и безопасность для здоровья человека [4, 12, 18, 25].

Микроорганизмы присутствовали на Земле 3,5 – 4 миллиарда лет назад и с тех пор развиваются и распространяются в новых средах, существующих повсюду. Их присутствие привело к развитию новых экосистем, некоторые из которых стали основой эволюции более сложных организмов. Микроорганизмы способны генерировать сигналы для формирования метаболически разнообразных сообществ. Без метаболизма и связи между микроорганизмами рециркуляция основных питательных веществ на Земле остановилась бы. При помещении в суровую окружающую среду микроорганизмы справляются и процветают, адаптируясь и продуцируя различные первичные и вторичные метаболиты, которые в первую очередь опосредуют критические функции в жизненном цикле продуцирующего микроорганизма. Однако было показано, что эти метаболиты, образующие в результате процессов биосинтеза, имеют потенциальное промышленное применение в том числе в сфере получения пищевых ингредиентов [2-3, 7, 21, 22, 34-36].

# Глава 1. Технологии биосинтеза пищевых ингредиентов с использованием дрожжей

## 1.1. Общая характеристика пищевых ингредиентов

Согласно ТР ТС 021/2011 *компонент пищевой продукции (пищевой ингредиент)* (далее – компонент) – продукт или вещество (включая пищевые добавки, ароматизаторы), которые в соответствии с рецептурой используются при производстве (изготовлении) пищевой продукции и являются ее составной частью.

В современном теоретическом представлении пищевые ингредиенты рассматриваются как инновационный инструмент обеспечения стабильности качества пищевой продукции. В пирамиде факторов качества продукции пищевые ингредиенты занимают важное место и представлены в двух аспектах значимости – как основополагающие сырьевые компоненты для производства продуктов питания и как пищевые микроингредиенты, для обеспечения потребительских свойств.

Проект комплексной отраслевой «Программы развития производства ингредиентов (пищевые и биологически активные добавки, ароматизаторы и технологические вспомогательные средства и прочие сырьевые компоненты) в Российской Федерации до 2030 года» предполагает правовое признание отрасли «Пищевые ингредиенты» и предусматривает максимальное использование имеющихся отечественных сырьевых ресурсов.

Количество пищевых ингредиентов разрешенных для применения в пищевой индустрии в ЕАЭС и РФ на сегодняшний день составляет около 364 единиц, которые распределены в четыре класса с учетом выполнения в продукте основных функций: улучшители внешнего вида, регуляторы вкуса, регуляторы консистенции, пищевые ингредиенты для увеличения сохранности. Заинтересованность государства в формировании собственного рынка пищевых микроингредиентов объективна, так как РФ является высоко импортозависимой в данной группе товаров, особенно в части пищевых микроингредиентов. «Программа развития отечественного производства микроингредиентов на период до 2025 гг.» предполагает суммарное увеличение объемов их производства в России на 100 % (на долю российского рынка приходится 9 – 10 % мирового рынка ингредиентов; объем российского рынка около 3 млрд. долларов). ПМИ используемые для увеличения сохранности продуктов, при правильном применении способны обеспечивать безопасность и гарантировать сохранение потребительских характеристик на протяжении жизненного цикла пищевой продукции [1, 5, 8].

Среди приоритетной отрасли выделяются физиологически функциональные пищевые ингредиенты. Согласно ГОСТ Р 52349 – 2005 «Продукты пищевые. Продукты пищевые функциональные. Термины и определения» *физиологически функциональный пищевой ингредиент* – это вещество или комплекс веществ животного, растительного, **микробиологического**, минерального происхождения или идентичные натуральным, а также живые микроорганизмы, входящие в состав функционального пищевого продукта, обладающие способностью оказывать благоприятный эффект на одну или несколько физиологических функций, процессы обмена веществ в организме человека при систематическом употреблении в количествах, составляющих от 10 % до 50 % от суточной физиологической потребности.

К физиологически функциональным пищевым ингредиентам относят биологически активные и/или физиологически ценные, безопасные для здоровья, имеющие точные физико-химические характеристики ингредиенты, для которых выявлены и научно обоснованы свойства, установлены нормы ежедневного потребления в составе пищевых продуктов, полезные для сохранения и улучшения здоровья: пищевые волокна, витамины, минеральные вещества, полиненасыщенные жирные кислоты, пробиотики, пребиотики или синбиотики.

Безопасность применения пищевых ингредиентов обеспечивается при соблюдении требований Технических регламентов Таможенного союза:

- О безопасности пищевой продукции (ТР ТС 021/2011)
- Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств (ТР ТС 029/2012)
- Пищевая продукция в части её маркировки (ТР ТС 022/2011)
- О безопасности упаковки (ТР ТС 005/2011) и другие.

Приказом МСХ №70 от 19 февраля 2018 года был утвержден Перечень пищевых ингредиентов, необходимых для производства основных видов пищевой продукции. Основной вектор развития отечественной индустрии пищевых ингредиентов связан с более полным использованием имеющихся в стране растительных ресурсов (т.е. глубокая переработка сырья и вторичных сырьевых ресурсов) для получения красителей, подсластителей, антиоксидантов, эмульгаторов, стабилизаторов и т.д., а также активным развитием и наращиванием объемов микробиологического синтеза пищевых ингредиентов.

Проектом комплексной отраслевой «Программы развития производства ингредиентов (пищевые и биологически активные добавки, ароматизаторы и технологические вспомогательные средства и прочие сырьевые компоненты) в Российской Федерации до 2030 года» в качестве ключевых направлений обозначены:

- создание реестра коллекций микроорганизмов-продуцентов пищевых ингредиентов;
  - селекция методами генной инженерии штаммов-продуцентов пищевых добавок;
  - разработка биотехнологии индивидуальных пищевых добавок с учетом имеющихся сырьевых ресурсов;
  - создание коллекции микроорганизмов, синтезирующих эндополисахариды, для замены импортных загустителей пищевых систем.
- Указанные направления подтверждают актуальность развития технологий биосинтеза пищевых ингредиентов с участием микроорганизмов.

## **1.2. Основы процесса биосинтеза**

Согласно мнению ряда ученых биотехнология является основной областью прикладной микробиологии. Микроорганизмы в последние десятилетия активно используются для производства фармацевтических препаратов, которые иначе не могли бы быть изготовлены, среди них человеческий гормон инсулин, противовирусное вещество интерферон, многочисленные ферменты, а также ряд вакцин [4, 13, 22, 31, 32].

Развитие микробиологии привело к появлению новых направлений практического применения микроорганизмов в различных областях науки, в том числе в отрасли пищевых систем.

*Микробная биотехнология* основывается на использовании микроорганизмов в промышленности для производства важных пищевых ингредиентов, таких как, ферменты и аминокислоты, пигменты и витамины, органические кислоты и спирты, которые образуются в процессе ферментации, приобретая собственную экономическую ценность [2, 3, 26, 27].

В 1917 году венгерский инженер Карл Эрекв определил термин «*биотехнология*» как «все направления работы по использованию сырья для производства жизнеспособных веществ с помощью живых существ». Биотехнология по сути является продуктом взаимодействия науки о биологии и технологии. Продукты биотехнологии оказывают большое влияние на качество жизни человека, играя важную роль на пути к устойчивому использованию и производству возобновляемых биоресурсов.

Бактерии широко использовались в биологических исследованиях из-за их активного роста и относительно простой клеточной организации. Микробные метаболиты, в частности пищевые ингредиенты, синтезируемые в процессе биосинтеза микробной клеткой являются промежуточными продуктами микробного обмена и могут быть разделены на первичные и вторичные метаболиты [2, 9, 25].

*Первичные метаболиты* – это метаболиты, образующиеся во время экспоненциальной фазы культуры. Первичный метаболит является ключевым компонентом в поддержании нормальных физиологических процессов; таким образом, его часто называют «центральным метаболитом». Первичные метаболиты образуются в течение экспоненциальной фазы в качестве конечных продуктов и участвуют в росте, развитии и размножении, следовательно, они необходимы для выживания и существования организма. При первичном метаболизме кривая продукции связана с кривой роста, и метаболиты, такие как витамины, аминокислоты или нуклеозиды, вырабатываются в достаточном количестве для поддержания роста клеток. Аминокислоты, нуклеотиды, белки, углеводы, липиды и витамины являются основными метаболитами, необходимыми для роста клеток, тогда как этанол и органические кислоты необходимы для получения энергии [2, 4, 25, 28, 35].

*Вторичные метаболиты* синтезируются в конце или около стационарной фазы роста и не участвуют в росте, развитии или размножении клеток. Многие из идентифицированных вторичных метаболитов выступают в качестве защитного механизма (механизмов). Вторичные метаболиты вырабатываются микроорганизмами, когда один или несколько питательных веществ в культуральной среде истощаются. Несмотря на то, что вторичные метаболиты не важны для роста микроорганизмов, они синтезируются в ответ на конкретные условия окружающей среды. Разные штаммы микроорганизмов могут продуцировать различные метаболиты. Примерами являются антибиотики, пигменты, алкалоиды и гиббереллины [3, 4].

Процесс биосинтеза – это образование органических соединений живым микроорганизмом. В биосинтезе простые соединения модифицируются, превращаются в другие соединения или соединяются вместе, образуя макромолекулы. Этот процесс включает в себя множество метаболических путей, некоторые из которых расположены в одной клеточной органелле, в то время как другие включают ферменты, которые находятся в нескольких клеточных органеллах. Биосинтез происходит из-за ряда химических реакций, в которых соединения-предшественники, каталитические ферменты, кофакторы и химическая энергия необходимы для того, чтобы эти реакции имели место. Особенности биоактивных микробных метаболитов являются их взаимодействие с окружающей средой и их уникальная химическая структура. Пищевые ингредиенты, получаемые в результате биосинтеза могут практически использоваться тремя различными способами:

– применение пищевого ингредиента в качестве конечного продукта непосредственно в технологии пищевых производств, медицине, сельском хозяйстве или в любых других областях;



– пищевой ингредиент может использоваться в качестве исходного материала для последующей химической или микробиологической модификации (дериватизации);

– пищевой ингредиент может использоваться в качестве соединения для химического синтеза новых аналогов или в качестве шаблона при оптимизации процесса биосинтеза [2-4, 25, 26].

### **1.3. Инновационные подходы интенсификации биотехнологических процессов**

Физиологические параметры микробиологических клеток и интенсивность процессов биосинтеза неразрывно связаны между собой. Поэтому большой интерес представляют исследования, направленные на изучение влияния различных воздействий на клетку извне, изменяющих ряд жизненно важных параметров микробных клеток таких как рост, метаболизм, образование ферментов под их влиянием.

Методы направленного воздействия получили широкое распространение. Влияние температуры, давление, свойства ультразвука, электричества, электромагнитные поля, различный агрегатный статус воды в средах для выращивания, небольшой уровень радиации.

Электрический ток действует прямо на вещество либо объект, что обуславливает возможность его применения. Электрический потенциал присутствует в любой живой клетке. Благодаря импульсному воздействию тока на клетку, на определённый промежуток времени резко возрастает её клеточная проницаемость из-за образования в мембране сквозных пор.

Известны исследования, в которых было предложено перед засевом клеток на питательную среду воздействовать на них 1 – 3 импульсами электрического поля 2 – 5 кВ/см и 10 – 50 мкс. Выращивание при этом проводят в субстрате с температурой 28 – 30°C. В результате такой обработки накопление биомассы у *Saccharomyces cerevisiae* увеличивалось в 1,5 – 2 раза [9, 25, 27].

Поле высоковольтных самостоятельных электрических разрядов в газе достаточной плотности (коронный разряд) обладает активизирующим влиянием на дрожжевые клетки. Воздействие на дрожжевые клетки тока разных частот значительно повышает скорость сбраживания глюкозы. При диапазоне частот- 200-300 Гц скорость сбраживания глюкозы возрастает на 37 % [23].

С целью управления технологическими процессами, протекающими в присутствии различных микроорганизмов, устанавливали зависимость частот и продолжительности воздействия электромагнитного поля низких частот (ЭМП КНЧ) на живые клетки. Влияние электромагнитного поля

пагубно сказывается на контаминирующие микробиологические агенты сырья для производства вина, например на жизнедеятельность лишних в винопроизводстве микроорганизмов, синтезирующих молочную и уксусную кислоты. После ЭМП КНЧ технологический процесс сбраживания значительно сокращается из-за интенсивного роста биомассы дрожжевых клеток и стимулирующего влияния на активность энзимов [19].

Морфология и физиология микроорганизмов значительно изменяется при обработке клеток лазером.

Изменения в ультраструктурах клетки в результате обработки её лазером, положительно сказывающиеся на биотехнологических свойствах штамма, способны сохраняться годами. Благодаря исследованиям ряда авторов, известно о стимулирующем действии ультрафиолетового излучения на биосинтез клетки. Известны методы воздействия на дрожжевые клетки *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* УФ-лучей и нагревания с целью селекции дрожжевых клеток, используя которые можно увеличить интенсивность получения этилового спирта в условиях повышенной температуры.

Микробиологические клетки способны проявлять резистентность по отношению к термошоку. Данное свойство проявляется, после помещения клетки на короткое время в условия высокой, но не критичной температуры. Данная клетка, перенесённая затем в комфортные условия, типичные для данного штамма резистентна по отношению к высоким температурам. Явление терморезистентности основано на синтезе широкого спектра протеинов теплового шока.

Приобретение термоустойчивости в результате теплового шока гарантирует резистентность микробных клеток от других физических факторов. Например, повышается устойчивость к концентрации спирта – и осморезистентность.

Проводились эксперименты по влиянию лучевого инфракрасного потока на дрожжевые клетки рода *Saccharomyces* с целью повышения активности процесса брожения пивного сула. Было открыто интенсифицирующее влияние инфракрасного облучения на дрожжевые клетки в течение 30 секунд. Более продолжительная обработка клеток инфракрасным излучением ингибирует жизненные функции дрожжевых клеток. ИК излучение, к тому же, оказывает положительный эффект на процессы почкования, накопления запасных веществ пищи, интенсивность брожения и способность дрожжевых клеток к коагуляции. Результатом воздействия ИК на дрожжевые клетки в течение 30 секунд является увеличение бродильной активности на 25 % по сравнению с контрольной группой. Скорость накопления биомассы увеличивается на 2 – 3 %, масса продукции на выходе на – 10 – 15 % [13, 25, 28].

Небольшие радиоактивные дозы так же способны оказывать влияние на процессы жизнедеятельности микроорганизмов. Исследования влияния радиации на ряд различных микроорганизмов выявили активизирующее действие облучения, выражающееся в более активном делении клеток, уменьшения времени процесса генерации и возрастании клеточной биомассы. Выявлена роль облучения малыми радиоактивными дозами [до 10 крад] на интенсификацию активности ферментов у дрожжевых клеток и кратному увеличению спирта на выходе [13].

Существует метод влияния на клетки микроорганизмов с помощью ультразвукового воздействия. Воздействие низкочастотных ультразвуковых колебаний позволяет ускорить массообмен между средой и дрожжами, и поглощение  $O_2$  воздуха, которым аэрируют пищевой субстрат. Установлено, что благодаря обработке ультразвуком (частота 100 Гц, амплитуда 7 – 8мм) дрожжевых клеток расы Кр-9, выход дрожжевых клеток возрос с 43,2 до 51 % по ассимилируемым углеводам. Интенсивность поглощения кислорода увеличивается в 1,35 раза в отличие от контрольной группы. Дрожжевые клетки, подвергшиеся воздействию низкочастотных колебаний содержат увеличенное количество нитратов, протеинов и фосфора. Состав аминокислот остаётся неизменным [28].

Параллельно установлено, что увеличение содержания провитамина D2 в клетках дрожжевых клеток- сахаромицетов возможно лишь после ультразвуковой обработки. Содержание провитамина D2 в обработанных ультразвуком клетках больше примерно на 60 % по сравнению с контрольной группой.

Воздействие УЗ волн в небольшом объёме (0,72 кДж/см) не меняют показатели жизнеспособности или в малой степени их активируют. В экспериментах, направленных на изучение влияния на активность дрожжевых клеток высокочастотной и обработки лучами УФ спектра выяснено, что стимулирующий эффект высокочастотного воздействия оказывает гораздо больший эффект на увеличение активности культуры дрожжевых клеток, нежели облучение под ультрафиолетом.

Все более популярным становится использование активаторов роста биологической природы, которые представляют собой вещества, обладающие многокомпонентным действием на живые клетки. Стимуляторы биологического происхождения в составе вытяжек из растений и животных тканей, а также в продуктах микробного автолиза.

В последние годы исследователи изучают потенциал использования цианобактерий в различных промышленных отраслях. Существует метод стимуляции клеток микроорганизмов с помощью вытяжки из водорослей рода *Arthrospira platensis*, выступающей ценным источником биологически активных добавок для дрожжевых клеток, главным

образом витаминов и незаменимых аминокислот. Активация дрожжевых клеток осуществляется внесением препарата *Arthrospira platensis* в питательный субстрат, либо на логарифмическом этапе выращивания дрожжевых клеток в объёме – 0,01 – 0,05 %, в виде сухого порошка или растворённым в воде [13, 28].

Существует метод активации микроорганизмов с помощью экстракта, выделенного из остаточных пивных дрожжевых клеток. В состав экстракта входят различные вещества, выступающие основными активаторами роста и энзимных активностей дрожжевых клеток, повышающими бродильную активность и гарантирующими стабильную микробиологическую активность дрожжевых клеток. Экстракт благотворно влияет на процесс сбраживания с применением истощённых из-за многократного использования дрожжевых клеток и повышает их потенциал к росту и размножению и улучшению их физикохимических показателей жизнедеятельности [13, 19, 22].

Известен активатор, используемый для повышения выхода клеточной массы клеток микроорганизмов, в частности дрожжей и повышения их физиологических показателей, изготавливаемый из зеленых пшеничных ростков. Метод изготовления заключается в проращивании пшеницы в течение 5 – 12 дней с длительностью освещения 12 – 19 часов в сутки. Пророщенные зерна хранят в условиях отсутствия света при температуре 2 – 6 °С длительностью 3 – 7 дней. На следующем этапе готовят водный экстракт из проростков/

Биотин, являющийся транспортёром карбоксильных групп, обеспечивает нормальный рост дрожжевых клеток. Дрожжевые клетки, обработанные излучением УФ волн, и выращиваемые на субстратах, содержащих биотин, повышают выход этанола на 39 % по сравнению с контрольной группой.

Примерами питательных сред, включающих в состав разнообразные ростовые факторы выступают продукты автолиза дрожжевых клеток, вытяжки кукурузных зерен, биотин, аминокислоты и другие.

## Глава 2. Лабораторно-практические занятия по дисциплине «Биотехнологические основы производства пищевых ингредиентов».

### 2.1. Биотехнология получения пищевых ингредиентов с использованием дрожжей

#### Лабораторное занятие 1. Исследование жизнеспособности и физиологического состояния (жизнестойкости) дрожжей

##### *Пояснением к занятию*

Жизнеспособность дрожжевых клеток определяется либо методами культивирования, либо способами окрашивания.

##### *Методы, основанные на прижизненном окрашивании*

Способы окрашивания основаны либо на светлопольной, либо на флуоресцентной микроскопии. Наиболее широко распространенным красителем для светлопольной микроскопии является метиленовый синий («метиленовая синь»), который под действием ферментов восстанавливается живыми дрожжевыми клетками до бесцветных соединений. Эффективность данного метода зависит не только от состояния клеточной мембраны, но и от активности определенных оксидоредуктаз в клетке. Таким образом, отражается и жизнестойкость, и жизнеспособность дрожжей (мертвые клетки окрашиваются в синий цвет). Выяснилось, что, когда жизнеспособность клеток ниже уровня 90 %, этот метод несколько завышает оценку жизнеспособности.

Несмотря на относительную легкость применения, данный метод довольно субъективен и плохо воспроизводим, поскольку клетки могут являться жизнеспособными даже с частично поврежденными клеточными мембранами и пониженной ферментативной активностью. Метиленовый синий (рН 4,6) можно заменить метиленовым фиолетовым (рН 10,6). В щелочной среде достигается более надежный и менее субъективный результат с лучшей корреляцией размножения клеток и их окислительной способности.

Поскольку у оптических отбеливателей (красителей, используемых при светлопольной микроскопии) существует много ограничений, вместо них были предложены флуоресцентные красители. Действие этих красителей основано на:

- целостности мембраны. Красители *Mg-ANS* – магниевая соль 1-анилино-8-нафтален сульфоновой кислоты, пропидия йодид, *Sytox* оранжевый; *Berberinej* TZK, *FUN-1*;
- потенциале мембраны (*Oxonol* и *Rhodamine 123*);

– использовании эстеразосодержащих субстратов (диацетат флуоресцеина, диацетат карбоксифлуоресцеина и уксуснометиловый эфир кальцеина).

Для оценки жизнеспособности пивоваренных дрожжей применяют Mg-ANS, *Oxonol*, *Sytox* оранжевый и *Berberinej TZK*. На некоторых пивоваренных предприятиях используют *Mg-ANS*, поскольку считается, что он дает хорошие результаты при исследовании дрожжей с низкой жизнеспособностью, иногда наблюдающейся при повышенной концентрации сусла. Преимуществом флуоресцентных красителей является возможность их использования с проточной цитометрией. Это повышает чувствительность и объективность метода и снижает его трудоемкость [2, 3, 19].

#### *Методы, основанные на размножении клеток*

Существуют два основных способа, основанных на размножении клеток: выращивание в чашках Петри и на предметных стеклах. Выращивание клеток в чашках Петри производится на поверхности агаризованной питательной среды. Жизнеспособность оценивается по количеству КОЕ (колониеобразующих единиц) после их культивирования в течение 72 ч при температуре 27 °С. Отношение КОЕ к общему числу клеток в разведении выражается в процентах. Коэффициент вариации при использовании этих способов составляет 20 %. Этот метод может быть использован для прямого определения способности клетки к размножению, но для получения результатов требуется длительное время (три дня). Кроме того, возникают трудности, если клетки обладают высокой флокулирующей способностью.

Метод выращивания на предметных стеклах основан на микроскопическом наблюдении микроколоний, вырастающих на пленке питательного агара через 18 ч после культивирования. Используя этот способ, можно определить способность к размножению отдельной клетки. Таким образом, оба эти метода прямо определяют способность клетки к размножению, но требуют значительного времени для получения результатов.

#### *Определение физиологического состояния (жизнестойкости) дрожжей*

Под жизнестойкостью (витальностью) дрожжей понимают их активность или способность восстанавливаться после физиологического стресса.

Физиологическое состояние пивных дрожжей оценивается путем измерения концентрации внутриклеточных компонентов (резервного гликогена, количества стерина или АТФ), либо путем оценки метаболической активности. Последнюю оценивают различными способами, включая измерение окислительной способности,

продуцирование ионов магния, средний возраст клеток, внутриклеточное значение рН, скорость утилизации сахаров, образование этанола, высвобождение CO<sub>2</sub>, потребление кислорода и активность ферментов [2, 3, 7].

#### *Содержание стерина и ненасыщенных жирных кислот*

Стерины и ненасыщенные жирные кислоты являются важными компонентами мембраны клетки дрожжей, особенно при их росте в анаэробных условиях.

Поскольку молекулярный кислород необходим для биосинтеза эргостерина и ненасыщенных жирных кислот, стерины и ненасыщенные жирные кислоты при получении пива являются лимитирующими факторами роста дрожжей, и их содержание определяет физиологическое состояние дрожжевых клеток. Следовательно, начальное содержание стерина и ненасыщенных жирных кислот в клетке важный показатель способности роста и брожения дрожжей. С другой стороны, если перед брожением используются дрожжи с низким содержанием стерина в клетке, то может наблюдаться нормальное брожение при условии поступления достаточного количества кислорода на ранних стадиях брожения. Хотя стерины и ненасыщенные жирные кислоты являются важным фактором в определении хода брожения, вероятно, трудно использовать их начальное содержание как показатель жизнеспособности дрожжей.

#### *Содержание АТФ*

Определение АТФ популярный метод подтверждения жизнеспособности дрожжей, так как «мертвые» клетки АТФ не содержат. Если же оцениваются клетки одинакового физиологического состояния, то наблюдается корреляция между содержанием АТ в дрожжах и количеством живых клеток. Изменение условий культивирования дрожжей может привести к искажению результатов.

Следовательно, этот метод имеет свои ограничения, но он может быть полезным при определении физиологического состояния дрожжей в сочетании с другими параметрами.

#### *Измерение CO<sub>2</sub> и скорость потребления кислорода*

Измерение количества выделившегося CO<sub>2</sub> с помощью манометра Варбурга стандартный микробиологический метод, адаптированный к оценке пивоваренных дрожжей в сусле. Образование CO<sub>2</sub> определяется через увеличение давления в закрытых сосудах.

Этот метод дает воспроизводимые результаты, которые прямо коррелируют с бродильной активностью дрожжей, но содержит мало информации о росте дрожжей.

С другой стороны, у дрожжей с жизнеспособностью менее 90 % существует корреляция между ходом брожения и потреблением

кислорода. Снижение скорости потребления кислорода происходит параллельно снижению содержания в дрожжах липидов и гликогена. Хотя физиологическое значение скорости потребления кислорода неясно, эти два метода дополняют друг друга и полезны для определения вариаций жизненности дрожжей.

#### *Тест силы подкисления*

Этот метод был разработан как показатель метаболической активности дрожжей. Он был адаптирован для предсказания хода брожения.

Тест силы подкисления это метод, при котором измеряется снижение значения внеклеточного рН дрожжевой суспензии до (спонтанное снижение) и после добавления глюкозы. Уровень спонтанного подкисления является индикатором содержания гликогена, а индуцированный глюкозой уровень подкисления является индикатором скорости прохождения гликолитического пути. Этот метод является полезным, быстрым и удобным для определения жизнеспособности дрожжевых клеток.

Вариации активности дрожжей в условиях пивоварения очень незначительны, особенно у дрожжей с высокой жизненностью. Этот метод рекомендуется использовать, когда состояние различных образцов дрожжей значительно отличается друг от друга.

#### *Метод измерения внутриклеточного рН*

Метод измерения внутриклеточного значения рН более чувствителен относительно пивных дрожжей. Значение внутриклеточного рН, так же как и внеклеточного, зависит от протонного насоса и действия АТФ-азы в мембранах, активность которой взаимосвязана с интенсивностью размножения клеток.

#### *Измерение ферментативной активности*

Недостаток методов, измеряющих скорость размножения дрожжей, скорость сбраживания, подъем величины рН, количество определенных побочных продуктов брожения и т.д. в том, что результаты становятся известны только после окончания сбраживания пробных образцов. А это продолжается, как правило, в течение трех дней. К этому времени дрожжи уже применяются, и нужно иметь в виду, что используются только дрожжи со слабой бродильной активностью.

В процессе накопления биомассы в целях получения чистой культуры дрожжей в разных значениях температуры исследуются следующие ферментивные активности: PDH (пируватдегидрогеназа), PDC (пируватдекарбоксилаза), ADH (алкогольдегидрогеназа), MAL (мальтаза) и PFK (пируватфосфокиназа).

*Технологические факторы, снижающие физиологическое состояние дрожжей*



Основными причинами ухудшения физиологического состояния семенных дрожжей могут быть:

- поздний сьем дрожжей после их осаждения;
  - увеличение сроков хранения дрожжей;
  - недостаточное перемешивание дрожжей;
  - нарушение температурного режима во время хранения дрожжей;
- неправильное ведение дрожжей во время хранения; выбор среды хранения, например в воде; перемешивание (исключить кислород); хранение под небольшим давлением диоксида углерода.

## **Задание 1. Оценка жизнеспособности и физиологического состояния дрожжей**

### **1.1. Регидратация дрожжей**

Сухие дрожжи активно применяются для посева суслу в виноделии, пивоварении и других бродильных производствах. Они весьма перспективны для предприятий малой производительности, которые не располагают необходимым оборудованием для разведения чистой культуры дрожжей, поэтому используют препараты активных сухих дрожжей. Однако жизнеспособность таких дрожжей зачастую снижена, и количество мертвых клеток существенно превышает требуемый уровень. Использование сухих дрожжей непосредственно в производство зачастую приводит к гибели значительного количества клеток (до 30 % и выше).

Процесс регидратации – возвращение воды в клетку – происходит сравнительно быстро – 5...10 минут в зависимости от размера гранул. За этот период восстанавливается первоначальный вид клеточных структур. Затем наступает фаза реактивации, при которой происходит восстановление функций клеточных органелл и ферментной активности. Некоторые клеточные структуры при высушивании повреждаются и, если эти повреждения обратимы, то при реактивации происходит их восстановление.

Рекомендуемый режим регидратации: разведение в воде температурой 30-40 °С, гидромодуль 1:10 и время 10 минут.

**Задание. Проведите регидратацию представленного образца дрожжей согласно рекомендуемого режима.**

### **1.2. Изучение морфологии дрожжей и чистоты культуры**

Дрожжи, используемые в промышленности, называются *культурными дрожжами*. Так, в хлебопекарном производстве и в производстве спирта используются верховые дрожжи рода *Saccharomyces cerevisiae*. Дрожжи вида *Saccharomyces minor* нашли применение в производстве ржаного хлеба и кваса. В пивоварении используются низовые дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* и *Saccharomyces carlsbergensis*. Дрожжи-сахаромицеты имеют овальную форму, вегетативно размножаются почкованием, в

неблагоприятных условиях размножаются половым путем аскоспорами. Различные формы дрожжевых клеток представлены на рис. 1.

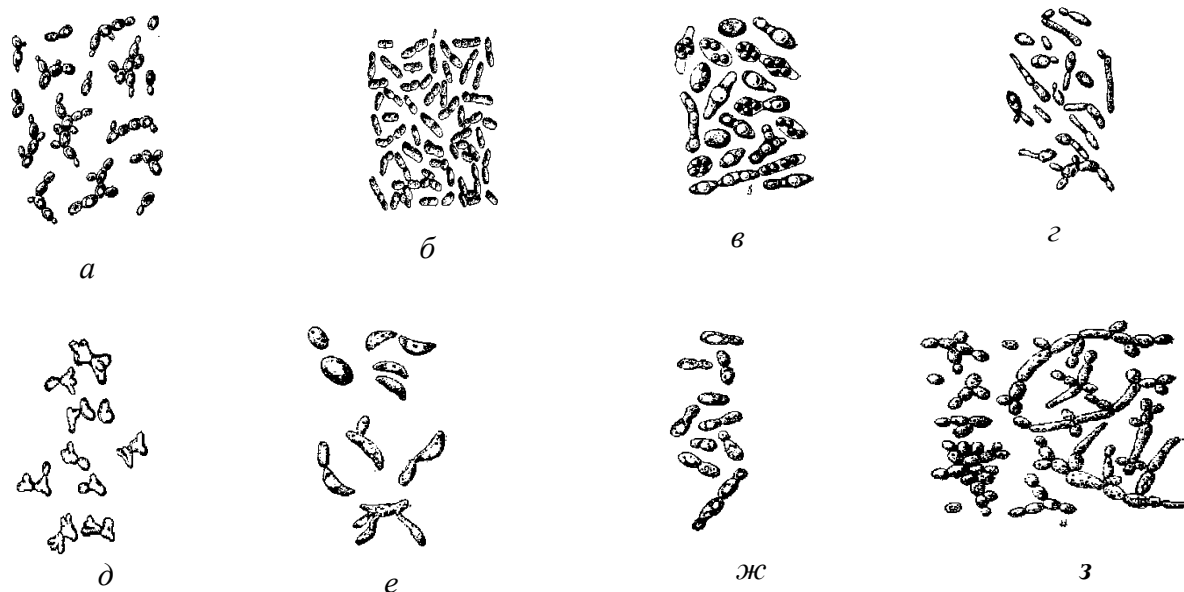


Рис. 1. Формы дрожжевых клеток: а – овальная яйцевидная; б – цилиндрическая; в – апикулятная; лимбовидная; г – стреловидная; д – треугольная; е – серповидная; ж – колбовидная; з, и – мицелиевидная

Культурные дрожжи должны быть стойкими к инфицированию. Тем не менее, посторонние микроорганизмы попадают в засевные производственные дрожжи при неправильном ведении технологического процесса, при недостаточно тщательной мойке и дезинфекции оборудования и коммуникаций, несоблюдении санитарного режима в отделении чистых культур и т.д.

Чаще всего производственным дрожжам сопутствуют молочнокислые, уксуснокислые бактерии и дикие дрожжи, которые, так же как и культурные дрожжи, используют сахара питательной среды в качестве основного источника питания, что снижает выход необходимых метаболитов, в частности спирта. Эти микроорганизмы образуют органические кислоты и другие продукты, которые могут отрицательно влиять на органолептические показатели готовой продукции (хлеба, пива) и бродильную активность культурных дрожжей. Хлебопекарные дрожжи, инфицированные посторонними микроорганизмами, имеют низкую ферментативную активность и стойкость.

**Молочнокислые бактерии** чаще других микроорганизмов встречаются в производственных дрожжах. Они принадлежат к трем родам: *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*. Стрептококки и лейконостоки имеют шаровидную форму клеток. Стрептококки располагаются друг относительно друга попарно, короткими и длинными цепочками, а лейконостоки в основном попарно. Отличием этих двух

родов друг от друга является то, что лейконостоки в отличие от стрептококков образуют слизистые капсулы. Лактобациллы являются палочковидными бактериями, которые в зависимости от вида могут располагаться поодиночке или короткими цепочками. Общими признаками этих бактерий являются грамположительная окраска, отсутствие спорообразования, каталазу они не образуют, не восстанавливают нитраты в нитриты, являются факультативными анаэробами. Молочнокислые стрептококки хорошо развиваются в средах, содержащих 3...6 % спирта, а палочковидные формы молочнокислых бактерий не теряют своей активности даже при 10...12 % спирта.

**Уксуснокислые бактерии** относятся к двум родам *Acetobacter* и *Gluconobacter*.

В производстве пива чаще всего встречаются бактерии вида *A. aceti*. Для этих бактерий характерна чрезвычайная изменчивость формы клеток – от эллиптических до палочковидных, прямых или слегка изогнутых. Грамотрицательные, спор не образуют, некоторые виды имеют слизистую капсулу. При росте в жидкой среде образуют пленки беловатого или сероватого цвета. Реакция на каталазу положительная. Аэробы. Оптимальное значение pH 5,4 – 6,3, но могут расти и при pH 4,0 – 4,5. Эти бактерии устойчивы к антисептическим веществам хмеля, высокой кислотности, толерантны к спирту. Некоторые виды выделяют соединения, токсичные для дрожжей.

В пивоваренном производстве в засевных производственных дрожжах очень часто встречаются **пивные сарцины** (род *Pediococcus*).

Некоторые спорогенные дрожжи являются **дикими дрожжами**. Эти дрожжи так же, как и культурные, способны осуществлять спиртовое брожение, но помимо спирта образуют много побочных продуктов (таких как альдегиды, высшие спирты, эфиры и др.) и поэтому ухудшают органолептические показатели продукта. Эти дрожжи являются вредителями производства различных напитков (пива, вина, безалкогольных напитков), а также возбудителями порчи многих пищевых продуктов. К дрожжам-вредителям бродильного производства относятся дрожжи родов *Pichia*, *Hansenula*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Torula*, *Torulopsis*, *Mycoderma*, *Trichosporon* и др. Среди аспорогенных дрожжей встречаются **ложные дрожжи**, которые образуют псевдомицелий и растут на жидких субстратах в виде пленок.

Помимо вышеперечисленных групп микроорганизмов, инфицирующих производственные дрожжи, в них могут присутствовать **гнилостные бактерии**. Это спорообразующие грамположительные бациллы и клостридии и грамотрицательные не образующие спор палочковидные бактерии. Гнилостные бактерии вызывают распад белковых веществ. В аэробных условиях они осуществляют полную

минерализацию белка, вплоть до диоксида углерода, аммиака, сероводорода, воды и минеральных солей. В анаэробных условиях гнилостные бактерии образуют различные органические дурнопахнущие и ядовитые вещества. Особую опасность представляют маслянокислые бактерии (*Clostridium butyricum*, *Clostridium pasterianum*, *Clostridium saccharobutyricum* и др.) и нитритобразующие бактерии (например, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*). Маслянокислые бактерии образуют масляную кислоту, а нитритобразующие бактерии превращают нитраты в нитриты. Эти соединения даже в очень малых концентрациях (0,0005 %) подавляют развитие культурных дрожжей.

**Биологическая чистота** является одним из самых важных показателей качества производственных дрожжей. Особое значение этот показатель имеет в пивоваренном производстве. Это связано с тем, что в пивоварении засевные производственные дрожжи используются в нескольких производственных циклах (до 10...12 генераций) и поэтому являются основным источником попадания в производство микроорганизмов-вредителей, вызывающих прокисание, помутнение, образование осадка в пиве и придающих продукту неприятные вкус и аромат. Биологическая чистота пивных дрожжей считается удовлетворительной, если в них содержится не более 1 % бактерий и не более 0,5 % диких дрожжей.

*Микробиологический контроль качества производственных дрожжей*

При контроле **засевных дрожжей** основным методом исследования является их *микроскопирование*. При микроскопировании дрожжевой суспензии определяют морфологическое состояние дрожжей, способность дрожжей к размножению, процентное содержание мертвых клеток, наличие посторонних микроорганизмов, содержание в дрожжах запасных питательных веществ (гликогена и волютина). В дрожжах хорошего качества морфологическое состояние должно быть удовлетворительным. Процентное содержание почкующихся клеток – высокое (40...70 %), дрожжей, содержащих гликоген должно быть не менее 70...75 %; биологическая чистота – удовлетворительная (не более 1% бактерий и 0,5 % диких дрожжей), количество мертвых клеток – не более 5 %. В дрожжах чистой культуры должны отсутствовать посторонние микроорганизмы и мертвые дрожжевые клетки. В засевных производственных дрожжах целесообразно также определять концентрацию дрожжевых клеток. Это исследование проводят с использованием счетной камеры Горяева.

**В производстве спирта** засевные производственные дрожжи регулярно просматривают под микроскопом, что дает возможность следить за их размножением, морфологическим и физиологическим состоянием, а также степенью загрязнения посторонними

микроорганизмами. В засевных дрожжах количество почкующихся клеток должно быть не более 3 %. Так как производственные дрожжи готовятся в не стерильных условиях, в них может присутствовать некоторое количество бактерий. О инфицировании засевных дрожжей кислотообразующими бактериями (молочнокислыми, уксуснокислыми) свидетельствует повышение титруемой кислотности более чем на 0,05 град. В сильно инфицированных дрожжах могут быть подвижные спорообразующие бактерии, распознавание которых осуществляют путем окраски раствором йода (маслянокислые бактерии при этом окрашиваются в серо-голубой цвет). Обращают также внимание на наличие диких дрожжей, количество мертвых клеток (не более 5 %). 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.

Путем микроскопирования определяют также процентное содержание мертвых и почкующихся клеток.

Значения этих показателей в процессе брожения меняется. Так, в первые часы брожения концентрация дрожжевых клеток в бражке составляет 100 – 150 млн./см<sup>3</sup>, почкующихся клеток – 10...12 %, мертвых – до 3...4 %. В дальнейшем концентрация дрожжевых клеток и процентное содержание мертвых клеток увеличивается, а относительное содержание почкующихся клеток уменьшается.

**Задание.** Из суспензии дрожжей приготовьте препарат раздавленная капля и оцените морфологию микроорганизмов (рис.1). Используйте объективы  $\times 8$  и  $\times 40$ .

Для определения чистоты культуры приготовьте фиксированный мазок из дрожжевой суспензии (окраска по Гаму, микроскопирование в иммерсионной системе с использованием объектива  $\times 90$ ). Рассматривают препарат минимум в 10 полях зрения. При микроскопировании обращают внимание на наличие посторонних бактерий и диких дрожжей.

### **1.3. Тест силы подкисления**

Состояние (жизненность и жизнеспособность) засеваемых дрожжей – очень важный фактор для правильного хода брожения. Состояние дрожжей определяется терминами жизнеспособность и жизненность. Жизнеспособность измеряется числом «мертвых или живых» клеток, а жизненность, или жизненная сила, – это мера интенсивности метаболических процессов или физиологического состояния живых клеток.

Тест «силы подкисления» используется, когда наблюдаются существенные различия в физиологическом состоянии сравниваемых образцов дрожжей.

Измерение значения внеклеточного рН дрожжевой суспензии проводится до (в течение 10 мин) и после добавления глюкозы (в течение 20 мин). Величина снижения значения внеклеточного рН, вызванная выделением дрожжами ионов Н<sup>+</sup>, определяет физиологическое состояние дрожжей. *Чем больше разница между начальным и конечным значениями рН, тем выше активность дрожжей.*

*Методика определения*

На аналитических весах с точностью до 0,1 г взвешивают навеску дрожжей массой 4 г. Дрожжи промывают в 100 мл проточной воды, центрифугируют 10 мин при N=6000 об/мин, затем тщательно перемешивают в 100 мл воды и определяют начальное значение величины рН суспензии. Далее с целью установления запаса гликогена, который расходуется в период лаг-фазы роста дрожжей, проводятся измерения величины рН через 5 и 10 мин. Показания вносят в табл. 1. Затем по нижеприведенной формуле определяется скорость падения рН – V<sub>1</sub>.

$$V = \frac{\ln[pH_1 / pH_2]}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

*Чем больше скорость падения рН, тем больше содержание резервных углеводов в клетках и тем интенсивнее протекают процессы метаболизма и короче лаг-фаза роста дрожжей:*

Таблица 1. Значения величины рН суспензии дрожжей до внесения углеводного субстрата

№ опыта	Время, мин			V <sub>1</sub>
	0	5	10	
1				
2				
3				
Среднее значение				

После снятия показаний (через 10 мин) добавляют 5 мл 20 %-го раствора глюкозы и перемешивают еще 10 мин. В ходе инкубации в течение 20 мин ежеминутно измеряют значения величины рН суспензии. Определения повторяются трижды, результаты записываются в табл. 2.

Таблица 2. Значения величины рН суспензии дрожжей после внесения углеводного субстрата

№ опыта	Время, мин					Жизненность дрожжей
	11	12	13	.....	30	
1						
2						
3						

По средним значениям данных, приведенных в табл. 1 и 2, строят график изменения величины рН в зависимости от длительности инкубации дрожжей и определяют жизненность дрожжей по разнице между начальным значением величины рН и величиной рН через 30 мин инкубации клеток (рН<sub>0</sub> – рН<sub>30</sub>).

#### **1.4. Окраска дрожжей метиленовым синим**

Наибольшее распространение получил метод выявления мертвых клеток с помощью метиленового синего.

После попадания в клеточную цитоплазму под действием ферментов редуктаз этот краситель восстанавливается живыми дрожжевыми клетками до бесцветных соединений. Мертвые клетки окрашиваются в синий цвет. Эффективность данного метода зависит не только от состояния клеточной мембраны, но и от активности оксидоредуктаз в клетке.

##### *Методика окрашивания*

Для определения количества мертвых клеток на предметное стекло наносят по одной капле нефльтрованной дрожжевой суспензии и раствора метиленовой сини (1:5000). Каплю закрывают покровным стеклом, излишек жидкости собирают листком фильтровальной бумаги и через 2 мин наблюдают окрашенный препарат с помощью микроскопа. В поле зрения микроскопа считают общее количество дрожжевых клеток, затем только синие, после чего препарат передвигают и подсчет ведут в новом поле зрения. Таким образом подсчитывают общее количество клеток (не менее 500) в пяти полях зрения. После подсчета вычисляют количество мертвых клеток в процентах.

#### **1.5. Окраска клеток метиленовым синим и сафранином**

Более полную информацию о физиологическом состоянии дрожжей дает окрашивание фиксированных препаратов метиленовым синим, танином и сафранином. Сафранин применяется для выявления клеточных ядер, которые окрашиваются в красный цвет. Если клетки живые и содержат оксидоредуктазы, расщепляющие метиленовый синий, то окрашенный препарат приобретает красноватый, а не фиолетовый оттенок.

##### *Методика окрашивания*

Дрожжи центрифугировать в течение 5 мин при скорости 4000 об/мин. Слить надосадочную жидкость, промыть физиологическим раствором и снова центрифугировать. Приготовить суспензию дрожжей.

Нанести каплю суспензии дрожжей на обезжиренное мылом предметное стекло. Оставить высыхать на воздухе при комнатной температуре. После высыхания капли зафиксировать препарат (10 раз провести стеклом в пламени спиртовки). Нагревать несильно. Не пережигать. Залить стекло раствором метиленового синего и выдержать в течение 4 мин при комнатной температуре. Смыть краситель теплой водой. Залить стекло свежеприготовленным раствором танина на 2 мин. Смыть краситель под струей воды. Залить на 16 мин стекло раствором сафранина. Смыть краситель.

Микроскопирование следует проводить нефлюоресцирующим маслом при увеличении  $\times 400$ .

#### **1.6. Окраска клеток раствором Люголя**

Физиологическое состояние можно определить также по составу клетки, например по запасным углеводам, одним из которых является гликоген.

Количество гликогена в клетках дрожжей меняется в зависимости от их возраста и условий культивирования. Для оценки используется раствор Люголя. Раствор Люголя окрашивает клетки в желтый цвет, а гликоген в коричневый.

Количество гликогена в дрожжах меняется в зависимости от их возраста и условий культивирования. В зрелых клетках гликоген занимает от 1/3 до 2/3 клетки и более. В клетках с низкой физиологической активностью окрашенный гликоген занимает менее 1/4 клетки. В молодых клетках гликоген отсутствует, а клетки при окрашивании раствором йода приобретают бледно-желтый цвет.

#### *Методика окрашивания*

Для качественной оценки уровня гликогена в дрожжевых клетках на предметное стекло петлей наносят небольшое количество дрожжевой суспензии и 2 – 3 капли раствора Люголя. Каплю накрывают покровным стеклышком, излишек жидкости удаляют фильтровальной бумагой и микроскопируют. Через 2 – 3 мин клетки дрожжей окрашиваются в желтый цвет, а гликоген в коричневый.

### **1.7. Экспресс-метод определения бродильной активности дрожжей**

Для оценки жизненной силы дрожжей используется модификация метода определения интенсивности выделения диоксида водорода в аппарате Варбурга.

В основе модификации аппарата Варбурга лежит тот же метод технологической оценки активности дрожжей по интенсивности выделения CO<sub>2</sub>, в котором учитывалось не время, затраченное на образование 10 мл диоксида углерода, а количество углекислоты, выделенное изучаемыми дрожжами за 1 ч. Это позволяет использовать таймер и упрощает процедуру оценки активности дрожжей. Время инкубации при необходимости можно сократить.

#### *Методика определения*

1 мл исследуемых дрожжей поместить в стеклянный стакан объемом 50 мл и добавить 0,5 мл 40 %-й глюкозы или мальтозы, 0,25 мл 8-кратной среды УР (8×2 % пептона, 8×2 % дрожжевого экстракта) и 0,25 мл воды. Все тщательно перемешать пипеткой и набрать в одноразовый медицинский шприц объемом 10 мл, стараясь избежать образования пузырей воздуха. Выдавить остатки воздуха из шприца и герметично запаять его конец. Для этого следует нагреть конец шприца в пламени спиртовки и расплавившийся пластик сжать металлическим пинцетом.



Герметично запаиваемые шприцы поставить в термостат при температуре 30 °С на 1 ч. Через 1 ч измерить высоту подъема поршня в шприце. По высоте подъема поршня определить количество образовавшегося CO<sub>2</sub>. По количеству выделившегося диоксида углерода можно оценить бродильную активность семенных дрожжей.

### **1.8. Экспресс-метод определения прироста биомассы дрожжей**

Для оценки жизненной силы дрожжей используется модификация метода определения прироста биомассы дрожжей.

В дрожжевой клетке диссимиляция сахара может происходить либо аэробным (дыхание), либо анаэробным (брожение) путем. Аэробное расщепление сахаров происходит по циклу Кребса. Образующаяся при этом щавелевоуксусная кислота может реагировать с аммиаком, превращаясь в аспарагиновую кислоту, являющуюся основой белковой структуры клетки. Другой путь питательного превращения углеводов – пентозофосфатный цикл. Предполагается, что основное значение этого цикла – снабжение живого организма пентозами, необходимыми для синтеза нуклеиновых кислот и накопления биомассы.

#### *Методика определения*

1 мл исследуемых дрожжей поместить в стеклянную пробирку объемом 10-20 мл и добавить 0,5 мл 20 %-й глюкозы, 0,25 мл 8-кратной среды YP (8×2 % пептона, 8×2 % дрожжевого экстракта) и 0,25 мл воды. Взвесить подготовленную смесь и поместить пробирку в термостат при температуре 30 °С на 1 ч. По истечении часа вновь взвесить пробирку. По увеличению массы пробирки можно оценить прирост биомассы дрожжей.

Оптимальная удельная скорость роста дрожжей не более 0,2 г/ч.

#### *Методика определения*

1 мл (0,1 г сухих дрожжей) исследуемых дрожжей поместить в стеклянную пробирку объемом 10-20 мл и добавить **0,5 мл** 20 %-й глюкозы, **0,25 мл** 8-кратной среды YP (8×2 % пептона, 8×2 % дрожжевого экстракта) и **0,25 мл** воды. Подготовленную смесь поместить в термостат при температуре 27 – 30 °С на 1 ч. По истечении часа оценить прирост биомассы дрожжей. Оптимальная удельная скорость роста дрожжей не более 0,2 г /ч.

Определение биомассы дрожжей и накопленного этанола проводят по следующим методикам:

1) Для измерения концентрации биомассы объем дрожжевой смеси доводят до 5 мл путем добавления H<sub>2</sub>O дистиллированной. Полученный образец центрифугируют при 5000 оборотов в течение 5 минут. *Надосадочную жидкость (супернатант) используют для определения концентрации накопленного этанола (см. п 2).*

Осадок фильтруют через мембранный фильтр (фильтровальную бумагу GF/C) (предварительно взвешенный), дважды промывая

дистиллированной водой и один раз – этанолом (95 %). Затем взвешиванием оценивают количество сырой биомассы. Для определения сухой биомассы дрожжей фильтр сушат до постоянного веса при 105 °С (для определения сухой биомассы дрожжей).

2) **Определение концентрации накопленного этанола** проводят с применением экспресс-анализатора «Колос».

Для этого надосадочную жидкость в количестве 3 мл разбавляют дистиллированной водой в 10 раз (до 30 мл). Используя показания прибора рассчитывают концентрацию накопленного этанола в мл/1г дрожжей с учетом коэффициента разбавления ( $\times 50$ ) и пересчета на 1 г ( $\times 10$ ).

## Лабораторное занятие 2. Изучение влияния внешних факторов на процессы дрожжевого биосинтеза

### **Пояснение к занятию**

Известно, что на процессы биосинтеза с использованием микроорганизмов весомое влияние оказывают внешние факторы воздействия, среди которых температура, рН, осмотический стресс, этанольный стресс и другие.

#### *Осмотический стресс*

Осмотическое давление возникает из-за стремления воды проникнуть через полупроницаемую мембрану в сторону более концентрированного из двух разделенных этой мембраной растворов. Такое давление прямо пропорционально концентрации молекул, которые не могут пройти через мембрану. Цитоплазматическая мембрана дрожжевых клеток характеризуется полупроницаемостью относительно воды и гидрофильных соединений с высокой молекулярной массой.

В настоящее время широко используется технология культивирования клеток в среде с высокой концентрацией углеводов. В этих условиях клетки испытывают гиперосмотический стресс. При этом дрожжи приобретают округлую форму и их поверхность становится морщинистой из-за утечки воды из клеток.

Реакция клеток на осмотический стресс зависит от плотности среды и ее углеводного состава, физиологического состояния дрожжей и стадии роста клеток. Размножающиеся клетки (лаг-фаза роста) более чувствительны к стрессу, чем клетки, находящиеся в стационарной фазе роста. Это объясняется разным химическим составом дрожжей, в частности содержанием в них резервных углеводов гликогена и трегалозы.

В связи с гиперосмотическим стрессом, который испытывают клетки в момент их внесения в питательную среду, требуется некоторое время для адаптации их к данным условиям, прежде чем дрожжи начнут размножаться. Эта стадия в развитии клеток называется лаг-фазой. В этот период существенно возрастает синтез глицерол-3-фосфатдегидрогеназы,

что приводит к увеличению внутриклеточной концентрации глицерина. Однако может пройти несколько часов до регистрации существенного увеличения содержания внутриклеточного глицерина.

В обычных условиях глицерин может проникнуть через цитоплазматическую мембрану, но при гиперосмотическом стрессе поры, через которые он выходит, закрываются и глицерин в период лаг-фазы не выделяется в среду. В процессе брожения стресс снимается и внутриклеточная концентрация глицерина уменьшается.

#### *Этанольный стресс*

Спирт образуется в процессе брожения, и влияние его на дрожжи определяется как этанольный стресс.

Токсическое свойство этанола – увеличение проницаемости и пористости клеточной мембраны, что приводит к проблемам с транспортом питательных веществ. Кроме того, наблюдается дефицит доступной воды в цитоплазме. Реакция клеток на воздействие этилового спирта в лабораторных условиях проявляется в увеличении степени ненасыщенности имеющихся в цитоплазматической мембране жирных кислот, в росте содержания эргостерина, синтезе трегалозы и продуцировании специфических белков термошока.

При содержании этанола в среде выше 1,2 % происходит снижение удельной скорости роста дрожжей. Концентрация спирта в среде 2 % и более приводит к уменьшению выхода биомассы. Полностью рост дрожжей подавляется при 8 – 9,5 %-м содержании этанола.

Этанол влияет на продолжительность времени генерации дрожжевой клетки. Повышение концентрации этанола с 0 до 1 % повышает время генерации примерно с 2,3 до 3,5 часов, а при концентрации этанола 3,8 % она составляет уже 6,9 ч.

Промышленные дрожжи в случае плотного пивоварения подвергаются воздействию высоких концентраций этанола. При экстрактивности начального сусла 23 % объемная доля спирта составляет более 9,0 %. Образующийся спирт угнетает как скорость размножения дрожжей, так и процесс брожения.

#### *Стресс, вызванный двуокисью углерода*

При концентрациях, эквивалентных давлению газа выше 0,2 атм, данное соединение стимулирует рост клеток. При давлении около 0,5 атм цикл трикарбонных кислот ингибируется, но спиртовое брожение продолжается вплоть до давления в 4,0 атм. Деление клеток прекращается при давлении около 2,5-3,0 атм. При этом клетки проходят через S-фазу (фазу синтеза ДНК), но не почкуются, и поэтому они характеризуются двойным составом ДНК и большими, чем обычно, размерами. При концентрациях двуокиси углерода, позволяющих клеткам расти,

отмечается явное его влияние на формирование сенсорных характеристик пива.

Исследователи до сих пор не пришли к единому мнению о биохимическом механизме действия двуокиси углерода.

#### *Окислительный стресс*

Относительно способности дрожжей противостоять окислительному стрессу проведено большое количество исследований. У клеток имеются защитные механизмы: например, на субстратном уровне – глутатион, полиамины, ионы металлов и др., а на ферментном уровне – это каталаза, супероксиддизмутаза, глутатионпероксидаза, тиоредоксинпероксидаза, а также редуктаза, метионинредуктаза и ДНК-восстанавливающие ферменты. В пивном брожении значение кислородного стресса не так велико, так как клетки подвергаются воздействию кислорода в течение короткого периода времени лишь в начале брожения, поэтому в ходе реакций, протекающих в митохондриях, в клетки поступает очень небольшое количество активного кислорода, способного отрицательно повлиять на жизнедеятельность дрожжей.

Как субстрат кислород очень важен для биосинтеза ненасыщенных жирных кислот и эргостерина, необходимых для роста клеток.

#### *Температурный стресс*

Температура оказывает значительное влияние на энергетический и конструктивный обмен клеток и, следовательно, воздействует на удельную скорость роста дрожжей и время генерации.

В определенных производственных условиях клетки могут испытывать температурный стресс (шок). Этот эффект проявляется, если дрожжи на короткий период времени подвергнуть воздействию достаточно высокой, но не губительной температуры. Устойчивость дрожжей к негативным внешним воздействиям связана с трегалозой, содержание которой в клетке определяется штаммовыми особенностями дрожжей и условиями культивирования.

Установлено, что клетки, пережившие воздействие высоких температур, приобретают не только термоустойчивость, но и спирто- и осмоустойчивость.

#### *Другие виды стресса*

На жизнедеятельности дрожжевых клеток отрицательно сказываются резкие колебания величины рН, гидростатический стресс, а также механический стресс в результате действия больших касательных напряжений (насосы, мешалки, регулировочные вентили).

*Величина рН* влияет на систему транспорта питательных веществ, на степень диссоциации компонентов среды, дисперсность, пространственную организацию и активность ферментных белков, на флокуляцию дрожжей.

Оптимальной величиной рН для размножения клеток пивных дрожжей является 4,8, так как при этом значении рН фермент транспорта мальтозы в клетку – мальтозопермеазы – имеет максимальную активность. При более низких значениях рН ускоряется потребление аминного азота.

По мере подкисления среды уменьшается заряд клетки и наблюдается ослабление взаимного отталкивания клеток и усиление флокуляции. В целом, дрожжи живут и размножаются в широком диапазоне рН от 2 до 6. Однако резкие колебания этого параметра также могут сказаться на активности ферментов, нарушении биосинтетической активности дрожжей и увеличении количества мертвых клеток.

*Гидростатический стресс* наблюдается при сбраживании суслу в высоких бродильных аппаратах (цилиндроконических танках – ЦКТ), высота которых может достигать 17 – 22 м. При этом происходит изменение проницаемости клеточных мембран и ферментной активности клеток.

*Механический стресс* возникает в результате действия больших касательных напряжений во время перемешивания дрожжей, перекачивания их из одной емкости в другую с помощью насосов. Эти механические операции могут «обдирать» поверхностный слой клеточной оболочки дрожжей, что приводит к изменению поверхностного потенциала клеточной стенки.

**Задание 1. Определение прироста биомассы дрожжей и накопленного этанола в зависимости от температуры и продолжительности брожения. Оптимизация условий брожения на основе регрессионного анализа (методика представлена ранее).**

Таблица 3 – Пример плана проведения эксперимента

Уровни	Входные параметры		Выходные параметры	
	Температура брожения, °С	длительность брожения, час		
Основной 0	24	24/84	Прирост биомассы дрожжей, г	Концентрация накопленного этанола мл/г
Верхний +	37	48/132		
Нижний –	11	12/36		
Интервал варьирования	13	12/48		
Сочетание факторов				
1	–	–		
2	+	–		
3	0	–		
4	–	+		
5	+	+		
6	0	+		
7	–	0		
8	+	0		
9	0	0		

### Лабораторное занятие 3. Оценка эффективности биосинтеза нуклеиновых кислот дрожжами

#### **Пояснение к занятию**

Нуклеиновые кислоты это биологические полимерные молекулы двух видов: ДНК и РНК. Они хранят всю информацию об отдельном живом организме, определяют его рост и развитие, а также наследственные признаки, передаваемые следующему поколению. По сути, в молекуле ДНК запрограммировано все, что нужно клетке для жизни. А именно от состояния клетки зависит функционирование всех органов и систем организма.

В настоящее время нуклеиновые кислоты выделяются в отдельную группу иммуномодуляторов. Их история началась еще в 1868 г., когда нуклеиновые кислоты были открыты швейцарским ученым Ф. Мишером. Уже в 80-х гг. того же века по инициативе отечественного ученого И. Горбачевского нуклеиновые кислоты стали применять с лечебной целью. Позднее, в 1911 г., М. Черноруцкий установил, что под влиянием дрожжевой нуклеиновой кислоты увеличивается количество иммунных тел.

Борьба за иммунитет стала лишь первым, но не единственным направлением по использованию нуклеиновых кислот в промышленных объемах.

Одним из экономически целесообразных и эффективных источников нуклеиновых кислот является биомасса дрожжей (табл. 1).

Таблица 4. Приблизительный химический состав сухих дрожжевых клеток

Состав	Химический состав (% в виде сухого вещества)	
	Пивные дрожжи ( <i>S. Uvarum</i> )	Дрожжи хлебопекарные ( <i>S. cerevisiae</i> )
Белка	48	42-46
Углеводы	36	30-37
Минеральные вещества	N / A	7-8
Нуклеиновые кислоты	3-6	6-8
Липиды	1	4-7
Влажность	7	2-5

Спектрофотометрическое определение суммарного содержания нуклеиновых кислот в дрожжевых клетках

#### **Сущность метода**

Методы количественного определения нуклеиновых кислот, основанные на спектрофотометрии в ультрафиолетовой области спектра, отличаются высокой чувствительностью и простотой проведения анализа. Необходимым этапом различных методов спектрофотометрического определения нуклеиновых кислот является их экстракция из биологического материала, сопряженная с гидролизом полинуклеотидов. В

связи с этим из исследуемого материала предварительно необходимо удалить свободные нуклеотиды.

В основе модификации спектрофотометрического метода определения суммарного содержания нуклеиновых кислот, предложенной А.С. Спириным, лежит экстракция их из биологического материала горячей хлорной кислотой с последующим определением поглощения экстрактов в ультрафиолетовой области спектра при 270 и 290 нм. Расчет содержания нуклеиновых кислот производится по формуле, предложенной автором.

### ***Порядок работы***

Навеску биомассы дрожжей (100 – 200 мг) помещают в центрифужную пробирку с 5 – 10 мл охлажденного 0,2 М раствора хлорной кислоты. Содержимое пробирки тщательно перемешивают и осадок отделяют центрифугированием (3000 об/мин, 10 мин).

Центрифугат отбрасывают и осадок повторно отмывают хлорной кислотой.

Такая предварительная обработка материала необходима для удаления кислоторастворимых нуклеотидов. После удаления центрифугата к осадку добавляют 5 – 10 мл 0,5 М раствора  $\text{HClO}_4$  и, закрыв пробирки пробками с воздушным холодильником, нагревают их в кипящей водяной бане в течение 30 мин. Эта процедура обеспечивает количественную экстракцию нуклеиновых кислот из исследуемого материала и их кислотный гидролиз до растворимых фрагментов.

Гидролизаты охлаждают, центрифугируют и на спектрофотометре определяют в центрифугате поглощение в ультрафиолетовой области спектра в диапазоне 260 – 290 нм против контрольного раствора – 0,5 М  $\text{HClO}_4$ . По данным рассчитывают содержание фосфора нуклеиновых кислот в 1 мл исследуемого раствора, пользуясь формулой:

$$C_{\text{мкг}} = \frac{D_{270} - D_{290}}{0.19} \quad (2)$$

где 0,19 – поглощение 1 мкг фосфора нуклеиновых кислот, содержащегося в 1 мл раствора.

Для пересчета количества нуклеинового фосфора на количество нуклеиновых кислот пользуются средним пересчетным коэффициентом 10,3:

$$C_{\text{мкг НК}} = C_{\text{мкг}} \times 10,3 \quad (3)$$

Рекомендуется проводить дополнительное определение оптической плотности при 260 нм; оптическая плотность при 260 и 270 нм не должны различаться более чем на  $\pm 15\%$ .

**Задание.** Проведите оценку эффективности биосинтеза нуклеиновых кислот дрожжами. Для выполнения задания используйте предложенные преподавателем образцы дрожжей и питательных сред.

## Лабораторное занятие 4. Оценка эффективности дрожжевого биосинтеза эргостерина

### ***Пояснение к занятию***

Витамины являются важными соединениями для здоровья человека. Особую роль играют витамин эргостерин и его производные. В настоящее время одной из актуальных проблем в биотехнологии является поиск новых способов получения высших стероидов.

Таким образом, изучение механизмов биосинтеза эргостерина и его производных в биотехнологии имеет важное значение.

В клетках дрожжей эргостерол встречается в мембранах, сохраняется в его свободной форме в плазматической мембране и в качестве эфиров жирных кислот в липидах. Механизм производства эргостерола у дрожжей является сложным и является предметом многократных исследований, которые привели к довольно полному представлению об этом пути биосинтеза стерола. Специфические ферменты участвуют в биосинтезе эргостерина, катализируя превращение сквалена в ланостерол, зимостерол, эпистерол и, наконец, в эргостерол.

Эргостерол является предшественником эргокальциферола, также известного как витамин D<sub>2</sub>, который превращается в него через виостол путем воздействия УФ. По этой причине эргостерол известен как провитамин D<sub>2</sub>.

Из-за наличия асимметричного центра в молекуле эргостерола его химический синтез является сложным и требует много шагов с высокими материалами и потреблением энергии, а выход низкий. В связи с чем, аэробные процессы ферментации стали наиболее привлекательными методами для производства эргостерола. Среди различных потенциальных производителей эргостерола предпочтение отдается различным штаммам *S. cerevisiae*, как наименее требовательным и наиболее изученным микроорганизмам.

**Задание. Спектрофотометрическое определение суммарного содержания эргостерина в дрожжевых клетках**

### ***Сущность метода***

Сущность способа заключается в том, что извлекают стерин из субстрата 70 % этиловым спиртом и рассчитывают количественное содержание стероидов по оптической плотности в концентрированной серной кислоте при максимуме поглощения 328 нм в пересчете на эргостерин.

### ***Порядок работы***

Навеску биомассы дрожжей 200 – 500 мг помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 200 мл, добавляют 100 мл 70 % этилового



спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на весах с точностью до  $\pm 0,01$  г.

Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 30 мин, затем закрывают той же пробкой, охлаждают до комнатной температуры, после чего колбу снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы.

Извлечение перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр. 1 мл полученного извлечения помещают в градуированную пробирку на 10 мл, добавляют осторожно по каплям 4 мл серной кислоты концентрированной и нагревают на водяной бане при температуре  $70^\circ\text{C}$  в течение 1 часа.

Затем содержимое пробирки количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и объем доводят концентрированной серной кислотой до метки (испытуемый раствор А).

Измерение оптической плотности проводят сразу после приготовления раствора при аналитической длине волны 328 нм. Параллельно измеряют оптическую плотность раствора стандартного образца эргостерина.

Содержание эргостерин, и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot 25 \cdot 1 \cdot 25 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot m_0 \cdot 4 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot (100 - W)}$$

где А – оптическая плотность испытуемого раствора;

А<sub>0</sub> – оптическая плотность раствора стандартного образца;

m – точная навеска сырья, г;

m<sub>0</sub> – точная навеска эргостерина, г;

W – влажность сырья, %.

В случае отсутствия рабочего стандартного образца эргостерина используют значение удельного показателя поглощения его раствора – 800;

расчет содержания стероидов в пересчете на эргостерин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{E_{1\text{см}}^{1\%} \cdot m \cdot 1 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{800 \cdot m \cdot (100 - W)}$$

где А – оптическая плотность испытуемого раствора;

m – точная навеска анализируемого образца, г;

W – влажность сырья, %.

800 – удельный показатель поглощения эргостерина.

## 2.2. Биотехнология получения пищевых ингредиентов с использованием молочнокислых микроорганизмов

### Лабораторное занятие 1. Биосинтез экзополисахаридов молочнокислыми микроорганизмами

#### ***Пояснением к занятию***

Лактобактерии как продуценты органических соединений активно используются как в технологиях продуктов питания, так и в биотехнологических производствах. Биосинтез молочной кислоты, лактата, экзополисахаридов с применением лактобактерий является одним из перспективных экологических и экономических направлений.

Биотехнологические подходы, основанные на процессах биосинтеза с применением молочнокислых микроорганизмов, обладают техническим потенциалом и возобновляемой сырьевой базой, в частности значительными объемами отходов перерабатывающих предприятий, например сахарных заводов в виде мелассы [6, 10, 11, 14, 15].

Для обеспечения эффективности процессов биосинтеза в промышленных объемах важным является решение классических задач биотехнологии: оптимизация состава питательной среды, адаптация высокопродуктивных продуцентов к производственным условиям, обеспечение эффективного выделения целевого продукта.

Класс бактериальных полисахаридов, обозначенных как *экзополисахариды* (ЭПС), охватывает широкий спектр углеводных полимеров, которые синтезируются бактериями и секретируются во внешнюю среду. Активный интерес к ЭПС обусловлен тем, что они синтезируются большим разнообразием микроорганизмов и при этом обладают огромным потенциалом, как с фармацевтической точки зрения, так и технологической (применительно к пищевым производствам) [17, 29].

ЭПС можно классифицировать в соответствии с их химическим составом (который также отражает механизм биосинтеза) на две группы:

✓ *гомополисахариды*, состоящие из повторяющихся 10 или менее единиц моносахаридных остатков

✓ *гетерополисахариды* – это гетерополимеры, как правило высокомолекулярные (от 10 до 2000 кДа)

Независимо от их происхождения, ЭПС были классифицированы на основе их функциональности как:

- конструктивные или структурные,
- сорбционные,
- поверхностно активные,
- активные,

- информативные,
- окислительно-восстановительные,
- питательные вещества.

Что касается их биологических свойств, то в отношении перспектив использования ЭПС используют такие антитромботические, антикоагулянтные, иммуномодуляторы, противораковые, а также биофлокулянты.

Таблица 4. Микробные экзополисахариды, формирующие их мономеры и продуцирующие организмы

ЭПС	Продуценты	Мономеры
<b>Целлюлоза</b>	<i>Gluconacetobacter</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Rhizobium</i> и <i>Sarcina</i>	Глюкоза
<b>Курдлан</b>	<i>Agrobacterium sp.</i> (ранее таксономически классифицированных как <i>Alcaligenes faecalis var. myxogene</i> ), <i>Rhizobium sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i> и <i>Cellulomonas sp.</i>	Сахароза Глюкоза
<b>Декстран</b>	<i>Leuconostoc</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Weissella</i> , <i>Pediococcus</i> и <i>Lactobacillus</i>	Глюкоза
<b>Кефиран</b>	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> , <i>L. kefirgranum</i> , <i>L. parakefir</i> , <i>L. kefir</i> and <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	D-глюкоза и D-галактоза
<b>Геллановая камедь</b>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Глюкоза, Рамноза
<b>Гиалуроновая кислота</b>	<i>S. equisimilis</i> , <i>S. Pyogenes</i> , <i>S. thermophiles</i> и <i>S. equi</i>	Глюкуроновая кислота N-ацетилглюкозамин
<b>Леван</b>	<i>Bacillus</i> , <i>Brenneria</i> , <i>Geobacillus</i> , <i>Halomonas</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Zymomonas</i> и <i>Saccharomyces</i>	Фруктоза
<b>Пуллулан</b>	<i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Cytaria spp.</i> , <i>Teloschistes flavicans</i> , <i>Rhodototula bacarum</i> , <i>Cryphonectria parasitica</i>	Глюкоза
<b>Ксантановая камедь</b>	<i>Xanthomonas campestris</i>	Глюкоза, глюкуроновая кислота, пировиноградная кислота

### Характеристика отдельных экзополисахаридов

*Кефиран* – это водорастворимый экзополисахарид, продуцируемый *Lactobacillus kefiranofaciens*, *L. kefirgranum*, *L. parakefir*, *L. kefir* and *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*. Кефиран состоит примерно в равных пропорциях из D-глюкозы и D-галактозы [17, 20, 24]. Микроскопические исследования кефирных зерен показывают, что кефиран инкапсулирует на уксуснокислых бактериях и дрожжах, вовлеченных в процесс брожения. Он синтезируется на поверхности наружной мембраны клетки, причем

образует когезионно связанный слой в виде полисахаридной капсулы, обеспечивая поверхности клетки гидрофильные свойства.

Кефиран улучшает вязкоупругие свойства кислотных гелей молока, обладает противомикробным и ранозаживляющим свойствами, способностью снижать кровяное давление и уровень холестерина в сыворотке крови и способностью замедлить рост опухоли и повышению защитного иммунитета.

Доказано, что экзополисахарид кефиран обладает противоопухолевой и иммуномодулирующей активностью. В опытах на мышах, которым подкожно вводили клетки карциномы Эрлиха и саркомы, рост солидной опухоли был задержан на 40...59 % и 21...81 %, соответственно в группе животных, которым вводили в пищу или интраперитонеально кефиран, по сравнению с контрольной группой. Причем, непосредственно на опухолевые клетки *in vitro* этот полисахарид никакого действия не оказывает.

Кефиран имеет разветвленное строение и состоит из остатков глюкозы и галактозы примерно в равном соотношении. Структура кефирана представлена на Рисунке 1. По различным источникам кефиран может содержать глюкозу и галактозу в молярном отношении 1,00:1,05 , 0,9:1,1.

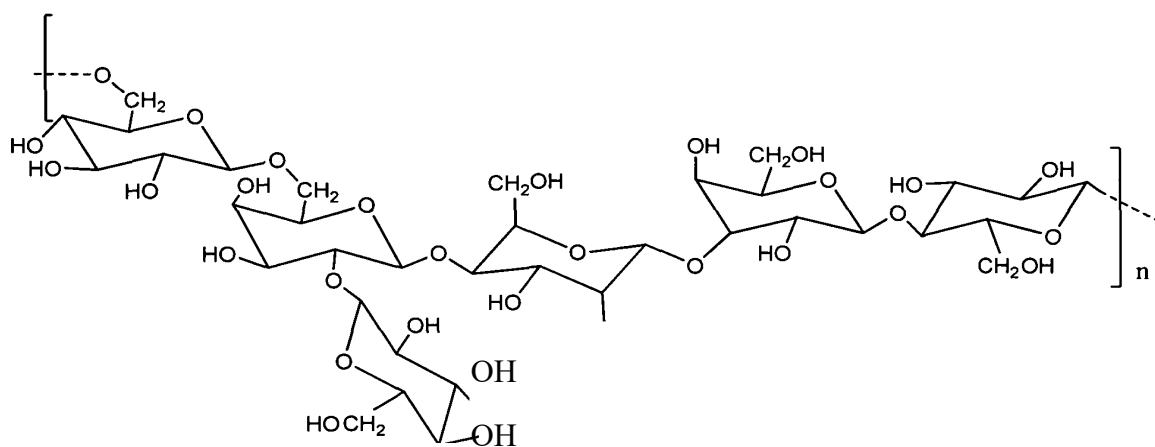


Рис.1. Структурная формула кефирана

Большое количество различных микроорганизмов способно к выработке внеклеточных полисахаридов, включая используемые для приготовления различных кисломолочных продуктов. Однако, состав и структура бактериальных полисахаридов очень многообразна; в их состав могут включаться остатки пентоз, гексоз, гептоз, аминсахаров, метилированных сахаров и уроновых кислот, а также неуглеводные остатки, такие как фосфат, аминокислоты, глицерин и рибитол. По этой

причине методы количественного определения ЭПС узкоспецифичны и, как правило, длительны и трудозатратны.

#### *Условия биосинтеза ЭПС*

На процесс биосинтеза ЭПС, в том числе и кефирана, оказывает влияние огромное число факторов, среди которых:

- продуцирующая способность штаммов микроорганизмов;
- состав питательной среды (в первую очередь, углеводный);
- аэрация;
- осмотическое давление;
- температура и другие.

В среднем для высокопродуктивных штаммов микроорганизмов достаточно 12 – 48 часов для продуцирования коммерчески целесообразного количества ЭПС.

**Задание 1.** Используя предложенные преподавателем штаммы микроорганизмов и питательные субстраты, подготовьте собственный образец стартовой культуры для биосинтеза ЭПС и последующего количественного их определения.

**Определите качественный состав микрофлоры заквасок, используя метод приготовления фиксированного препарата, окрашенного комбинированным фиксатором.**

#### *Оценка эффективности накопления экзополисахаридов*

##### **Сущность метода** определения кефирана (патент РФ № 2437092)

Метод основан на извлечении экзополисахарида кефирана из системы продукты методом осаждения и его фотоколориметрическом определении по глюкозе.

##### **Порядок проведения**

1 этап. Навеску продукта, содержащего ЭПС, в количестве 50 г выдерживают на кипящей водяной бане при постоянном перемешивании 10 минут. Раствор охлаждают, доводят до 50 мл и перемешивают.

2 этап. Раствор фильтруют через бумажный фильтр и отбирают 10 мл фильтрата в пробирку на 20 мл с делениями. Приливают 1 мл концентрированной соляной кислоты и выдерживают в термостате при 70 °С в течение 5 минут. Раствор охлаждают, добавляют 1 каплю 1 % фенолфталеина и титруют 20 % раствором гидроксида натрия до появления розового окрашивания, не исчезающего в течение минуты. Раствор доводят до 20 мл и перемешивают.

3 этап. После осаждения белкового осадка отбирают 4 мл надосадочной жидкости и переносят в пробирку для центрифугирования. Туда же вносят 8 мл холодного 96 % этилового спирта, пробирку закрывают крышечкой, встряхивают и оставляют на 1 час в морозильной

камере (температура  $-20^{\circ}\text{C}$ ). После раствор центрифугируют при 3000 об/мин в течение 20 минут. Жидкость аккуратно отбирают пипеткой, не встряхивая осадка, затем осадок промывают 12 мл холодного 50 % этилового спирта, снова центрифугируют и отбирают надосадочную жидкость.

4 этап. Затем осадок растворяют в 5 мл дистиллированной воды и переносят в пробирку с делениями, вносят 0,3 мл концентрированной серной кислоты, перемешивают, закрывают крышечкой и ставят на кипящую водяную баню на 2 часа. По прошествии этого времени раствор остужают и нейтрализуют 20 % раствором гидроксида натрия в присутствии фенолфталеина. Объем доводят до 10 мл.

5 этап. Затем отбирают 2 мл в пробирку, добавляют 1 мл щелочного раствора тетразолия хлорида (3 г тетразолия хлорида и 20 г гидроксида натрия на 1 л раствора), выдерживают на кипящей водяной бане в течение 3 минут, добавляют 1 мл 0,6 М уксусной кислоты, остужают и добавляют 6 мл изопропилового спирта и перемешивают. В случае выпадения осадка солей, раствор центрифугируют.

*!!! Параллельно проводят холостой опыт – вместо исследуемого раствора дистиллированная вода.*

6 этап. Снимают показания оптической плотности исследуемого раствора относительно холостого при длине волны 485 нм и толщине оптического слоя 10 мм.

По уравнению регрессии градуировочного графика для глюкозы находят массу полисахарида в исследуемом растворе:

$$m = 66,238 \cdot A + 58,661 \quad (4)$$

где  $m$  – масса полисахарида (глюкозный эквивалент), мкг;  $A$  – значение оптической плотности.

**Задание 2. Используя предложенную методику и ранее подготовленный образец, проведите количественный анализ накопленного экзополисахарида кефирана.**

### **2.3. Ферментативный биосинтез**

Лабораторное занятие 1. Биосинтез биологически активных веществ в процессе проращивания зерна

#### ***Пояснение к занятию***

Одним из прогрессивных направлений в развитии биосинтеза биологически активных веществ является использование технологии проращивания зерна.

Пророщенное зерно злаковых культур и продукты из него являются ценнейшими источниками пищевых волокон, витаминов группы В, токоферолов, макро- и микроэлементов.

Использование пророщенного зерна пшеницы получило достаточное широкое распространение при производстве пищевых ингредиентов растительного происхождения. Прорастание зерновых культур широко используется во многих странах. Во время прорастания некоторые из резервных материалов семян разлагаются и используются для дыхания и синтеза новых компонентов клеток развивающегося зародыша, что вызывает значительные изменения в биохимических характеристиках зерна. Прорастание зерна для получения побегов является одним из методов обработки, который может повысить питательную ценность и полезные свойства семян. Этот процесс повышает уровень свободных аминокислот, доступных углеводов, пищевых волокон и других компонентов, а также повышает функциональность семян благодаря последующему увеличению биологически активных соединений.

Имеются данные, что процессы прорастания зерна вызвали значительное увеличение антиоксидантной способности зерна из-за увеличения содержания витамина С, токоферолов и вторичных метаболитов, в том числе фенольных соединений, флавоноидов, феруловой кислоты и т.д.

В процессе проращивания зерна активируются гидролитические ферменты, которые участвуют в процессах разложения крупных биомолекул, таких как крахмал, некрахмальные полисахариды и белки, что также приводит к синтезу новых компонентов клеток в проросших зернах. Эти процессы биосинтеза приводят к изменениям в разложении и накоплении биологически активных компонентов.

Вместе с тем, огромное влияние на биохимический состав пророщенного зерна оказывают условия замачивания и собственно проращивания (величина гидромодуля, температура и продолжительность проращивания и т.д.).

Известно положительное влияние стрессовых воздействий, таких как воздействие холодной плазмы, СВЧ, ультразвука, солевой стресс и других.

Основной задачей, стоящей перед специалистами в данной сфере, является интенсификация и рационализация процесса проращивания зерновых культур для эффективного накопления в них биологически активных веществ.

*Обобщённая схема получения пророщенного зерна с применением ультразвукового воздействия:*

1. На первом этапе зерно промывают в проточной воде, затем ополаскивают дистиллированной водой

2. УЗ обработка: 25 г зерна помещают в стакан объемом 100 мл, заливают водой до общего объема 60 мл (гидромодуль в объемном соотношении должен быть не менее 1:1)

Обрабатывают УЗ в установленных режимах (табл. 5) при условии постоянного перемешивая стеклянной палочкой и контроле температуры (не выше 40 – 50 °С).

Таблица 5 –Характеристика объектов исследования

№ п/п	Мощность УЗВ	Время УЗВ
Контроль	–	–
Образец 1	X*	X
Образец 2	X	X
Образец 3	X	X
Контроль исх (не пророщенное)	–	–

\*X – по заданию преподавателя

2. Замачивание зерна длится 10 – 12 часов в условиях избыточного количества воды (3-5 см над зерновой массой).

3. Проращивание. В чашки Петри выкладывают фильтры из нетканого материала. Излишки воды из стаканов с замоченным зерном сливают через сито в другой химический стакан. Сливной водой хорошо увлажняют нетканые фильтры и на них выкладывают зерно толщиной слоя в 0,5 – 1 см.

Разносы накрывают пищевой пленкой и оставляют для проращивания на 48 часов при температуре 20±2 °С до появления ростков.

4. Сушка пророщенного зерна – осуществляют при температуре не выше 40 °С в условиях принудительной конвекции.

В полученном пророщенном зерне (используя усредненную пробу) определяют показатели, характеризующие протекание процессов биосинтеза БАВ:

- содержание полифенолов (в пересчете на галловую кислоту);
- содержание флавоноидов (в пересчете на эквивалент кверцетина);
- антиоксидантную активность (АОА) DPPH методом, %.

### ***Методы анализа***

#### **Получение экстрактов БАВ из образцов пророщенного зерна**

Пророщенное зерно диспергируют и экстрагируют биологически активные веществ по следующей методике:

0,5 г измельченного пророщенного зерна смешивают с 40 мл (70 об.%) этанола в конической колбе и выдерживают на встряхиваете в течение 1 часа. Затем полученный этанольный экстракт фильтруют и используют для определения содержания БАВ и АОА.



### 1. Определение содержания полифенолов методом Фолина-Чакольтеу.

Общее содержание полифенолов в экстрактах измеряли по методу Синглтона и Росси с использованием реагента Фолина-Чакольтеу.

0,1 мл каждого образца экстракта смешивают с 0,1 мл реагента Фолина- Чакольтеу, 1 мл 20 % (мас./об.) карбоната натрия и 8,8 мл дистиллированной воды. 30 мин выдерживают в темноте и измеряют поглощение при 700 нм с использованием спектрофотометра. В качестве стандарта используют галловую кислоту (25 – 250 мг / л;  $R^2 = 0,996$ ), и результаты выражают в мг-эквивалентах галловой кислоты.

Расчет ведут по формуле:

$$X = [(D_x - \frac{0.02670}{0.0083})]/12.5 \quad (5)$$

$D_x$  – оптическая плотность анализируемого раствора.

### 2. Определение общего содержания флавоноидов

Определение общего содержания флавоноидов проводили методике: 0,5 мл экстракта образца смешивали с 0,1 мл 10 % (мас. / об.) этанольного раствора хлорида алюминия и 4,3 мл дистиллированной воды. 30 мин выдерживают в темноте и измеряют поглощение при 415 нм. В качестве стандарта используют кверцетин (0,01-0,5 мг L-1;  $R^2 = 0,997$ ), и результаты выражают в мкг-эквивалентах кверцетина.

Расчет ведут по формуле:

$$X = [(D_x - \frac{0.0256}{0.0872})]/12.5 \quad (6)$$

$D_x$  – оптическая плотность анализируемого раствора.

3. *Общая антиоксидантная (антирадикальная) активность* методом DPPH (%) с модификацией. Использовали метанольный раствор DPPH 60 мкМ, 1 мл которого смешивали с 1 мл исследуемого раствора, инкубировали в темноте в течение 30 мин. Поглощение измеряли спектрофотометрически при 515 нм.

АОА рассчитывали по формуле:

$$АОА = \frac{1 - (D_i - D_j)}{D_c} \times 100, \quad (7)$$

где  $D_i$  – оптическая плотность исследуемого раствора;  $D_j$  – оптическая плотность контрольного раствора DPPH с метанолом;  $D_c$  – оптическая плотность раствора DPPH.

**Задание 1.** Проведите оценку биосинтеза полифенолов и флавоноидов в процессе проращивания зерна (по заданию преподавателя), а также оцените АОА пророщенного зерна в сравнении с контролем.

## Лабораторное занятие 2. Биосинтез функциональных пищевых ингредиентов (разработка пробиотических растительных продуктов).

### **Задание 1. Оценить жизнеспособность и степень адаптации молочнокислых микроорганизмов (пробиотиков) в системе растительных напитков**

#### ***Пояснение к занятию***

Пробиотики являются наиболее востребованными функциональными пищевыми ингредиентами в последние десятилетия. Лактобактерии, бифидобактерии – постоянный объектом исследований в микробной экологии человека. Практическое использование их положительных свойств иллюстрируется многолетним опытом изготовления и применения отечественных биопрепаратов (лактобактерин, ацилакт, аципол).

Значительная доля пробиотических пищевых продуктов представлена группой кисломолочных продуктов. Вместе с тем, давно известные своим потенциалом, злаковые культуры, в частности овес, ячмень, рожь, пшеница и другие становятся все более популярным как сырье для разработки новых ферментированных функциональных пищевых продуктов [29, 30, 33-36].

Так, овес и ячмень являются основными источниками бета-глюкана, признанного основным функциональным компонентом зерновых волокон. Исследования показали гипохолестеринемический эффект этого соединения, приводящий к снижению уровня холестерина на 20–30 %, и к ожидаемому общему эффекту снижения риска сердечно-сосудистых заболеваний. Низкий гликемический индекс овсяных продуктов особенно важен для диабетиков, а прием бета-глюкан-содержащих вязких продуктов влияет на уровень эмульгирования жира в желудочно-кишечном тракте и снижает активность липазы. Кроме того, бета-глюкан известен как пребиотик, стимулирующий рост некоторых полезных микроорганизмов, таких как бифидобактерии.

Все это обуславливает повышенное внимание к использованию растительных напитков на основе овса в качестве сырья для разработки новых ферментированных функциональных пробиотических продуктов.

#### **Подготовка стартовой культуры микроорганизмов для получения симбиотического продукта**

##### *Порядок проведения:*

Используйте предложенные преподавателем заквасочные культуры микроорганизмов, составьте их описание.

Для получение стартовой культуры внесите необходимое количество (0,5 г или согласно рекомендаций производителя) в 100 мл предварительно

стерилизованного обезжиренного молока\* (при 95 °С в течение 10 минут и охлажденного до 37 °С) с содержанием сухих веществ 5 – 7 %.

*\* обезжиренное молоко для стартовой культуры получают путем восстановления 5 – 7 г сухого молока в дистиллированной воде, выдерживая на встряхивателе в течение 20 мин при температуре 37 °С.*

Инкубацию проводят при температуре 37 °С в течение 12 – 14 часов. Готовую культуру центрифугируют в течение 10 мин, надосадочную жидкость сливают, оставшуюся часть используют для заквашивания напитков.

Количество клеток культуры должно составлять в среднем  $10^{11}$  КОЕ  $\text{мл}^{-1}$ .

**Задание 1. Проведите подготовку стартовой культуры микроорганизмов для получения симбиотического продукта. Сделайте описание препарата (описание состава микрофлоры).**

### **Подготовка зерновой основы для приготовления напитка**

*Порядок проведения:*

Для приготовления зерновой основы необходимо получить однородную цельносмолотую муку. Для этого предложенный преподавателем образец зерна промывают, сушат при температуре не выше 60 °С, измельчают и просеивают через сито.

Готовую муку заливают дистиллированной водой в соотношении мука:вода 7:100 (масса:объем). При необходимости к суспензии добавляют сахар пищевой 1-2 % и другие рецептурные компоненты.

Затем полученную суспензию нагревают при 95 °С в течение 10 минут и охлаждают до 37 °С.

**Задание 2. Проведите подготовку зерновой основы для приготовления растительного ферментированного напитка**

### **Ферментация зернового напитка**

*Порядок проведения:*

В подготовленный зерновой напиток вносят 5 % стартовой культуры. Ферментацию проводят при 37 °С в течение 12-14 часов. Хранят готовый напиток при 4–6 °С.

*Определение жизнеспособных клеток*

Подсчет жизнеспособных клеток проводят путем оценки числа колониеобразующих единиц на чашках с MRS-агаром (среда рН 5,7) после инкубации при 37 °С в течение 48 часов.

*Микроскопия фиксированного препарата, окрашенного комбинированным фиксатором*

*Определение рН, титруемой кислотности и сухого вещества*

Для измерения рН используют рН-метр.

Титруемую кислотность определяют путем титрования 10 мл образца 0,1 н. NaOH в присутствии фенолфталеина.

Содержание сухого вещества – рефрактометрически.

**Задание 3. Проведите ферментацию зернового напитка молочнокислыми культурами микроорганизмов и оцените их жизнеспособность**

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Авдеев, В.Г. Пробиотики и пребиотики в лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта / В.Г. Авдеев // Клиническая фармакология и терапия. – 2006. – Т. 15, № 1. – С. 36–41.
2. Бабьева, И.П. Биология дрожжей / И.П. Бабьева, И.Ю. Чернов. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2014. – 221 с.
3. Безбородова, А.М. Промышленная микробиология: учебное пособие / А.М. Безбородова, И.Н. Блохина. – М.: Высшая школа, 2009. – 688 с.
4. Биосинтез эргостерина. – <http://geum.ru/next/art-185248.leaf-6.php>.
5. Бондаренко, В.М. Препараты пробиотики, пребиотики и синбиотики в терапии и профилактике кишечных дисбактериозов / В.М. Бондаренко, Н.М. Грачева // Фарматека. – 2003. – № 7. – С. 56–63.
6. Ботвинникова, В.В. Практические предпосылки модификации технологии кисломолочных напитков для формирования заданных функциональных свойств / В.В. Ботвинникова, Д.Г. Ускова, Н.В. Попова // Вестник ВГУИТ. – 2016. – № 4. – С. 172–180.
7. Бутова, С.Н. Теоретические основы биотехнологии. Биохимические основы синтеза биологически активных веществ: учебное пособие / С.Н. Бутова, И.А. Типисева, Г.И. Эль-Регистан. – М.: Элевар, 2013. – 554 с.
8. Гаврилова, Н.Б. Синбиотический компонент для функциональных продуктов / Н.Б. Гаврилова, Е.А. Молибога // Молочная промышленность. – 2017. – № 7. – С. 56–57.
9. Давыденко, С.Г. Создание и применение нового экспресс-метода оценки качества семенных дрожжей / С.Г. Давыденко // Пиво и напитки. – 2012. – № 5. – С. 20–24.
10. Забодалова, Л.А. Полисахариды вешенки в производстве йогурта / Л.А. Забодалова, Т.Н. Беякова, Е.В. Антонцева и др. // Молочная промышленность. – 2019. – № 2. – С. 54–55.
11. Захарова, Л.М. Изучение технологических характеристик функционального кисломолочного продукта и его пищевой ценности / Л.М. Захарова, С.С. Лозманова, Л.В. Крохалева // Актуальная биотехнология. – 2014. – № 1 (8). – С. 12–15.
12. Калинина, И.В. Оценка эффективности процесса биосинтеза этанола дрожжами рода *Saccharomyces* / И.В. Калинина, Р.И. Фаткуллин, Н.В. Попова, А.Р. Шарипова // Вестник ЮУрГУ. Серия «Пищевые и биотехнологии». – 2018. – Т. 6 – № 4. – С. 74–82.

13. Карпенко, Д.В. Способы активации дрожжей при сбраживании плотного суслу / Д.В. Карпенко, Е.О. Чуланов // Пиво и напитки. – 2008. – № 5. – С. 26–27.
14. Каширская, Н.Ю. Значение пробиотиков и пребиотиков в регуляции кишечной микрофлоры / Н.Ю. Каширская // Русский медицинский журнал. – 2000. – № 13. – С. 13–14.
15. Кириченко, И.С. Разработка продуктов питания функционального назначения, обогащенных сырьем растительного происхождения «здоровый завтрак три – О» / И.С. Кириченко // Научный Вестник ГАОУ ВО «НГГТИ». – 2016. – Т. 3. – С. 43–47.
16. Красникова, Л.В. Общая и пищевая микробиология: учебное пособие. Часть I / Л.В. Красникова, П.И. Гунькова. – СПб.: Университет ИТМО, 2016. – 134 с.
17. Крючкова, В.В. Пребиотики в функциональных кисломолочных продуктах / В.В. Крючкова // Молочная промышленность. – 2009. – № 7. – С. 34–36.
18. Ламберова, М.Э. Оценка эффективности культивирования дрожжей *Saccharomyces Cerevisiae*: учебное пособие / М.Э. Ламберова, Ю.А. Кошелев. – Барнаул: ИИО БТИ АлтГТУ, 2017. – 69 с.
19. Меледина, Т.В. Закономерности роста и размножения хлебопекарных дрожжей на бесприточных стадиях технологического процесса накопления биомассы / Т.В. Меледина // Вестник МАХ. – 2016. – №4. – С. 31–35.
20. Мкртчян, Е.Ю. Новый функциональный рекомбинированный растительно-молочный продукт / Е.Ю. Мкртчян, В.И. Носкова, А.С. Егоров // Современные аспекты молочного дела в России: сборник материалов научно-практической конференции (Вологда 22-23 ноября 2007 г). – Вологда, 2007. – С. 66–67.
21. Мудрецова-Висс, К.А. Микробиология, санитария и гигиена: учебник для вузов / В.А. Мудрецова-Висс, А.А. Кудряшова, В.П. Дедюхина. – М.: ИНФРА-М, 2014. – 354 с.
22. Нетрусов, А.И. Микробиология / А.И. Нетрусов, И. Б. Котова. – М.: «Академия», 2016. – 136 с.
23. Осипова М.В. Интенсификация брожения пива посредством электронно-ионной обработки (ЭИО) пивных дрожжей / М.В. Осипова, Л.Ф. Глущенко // Пиво и напитки. – 2016. – № 5. – С.22–24.
24. Потороко, И.Ю. Антиоксидантные свойства функциональных пищевых ингредиентов, используемых при производстве хлебобулочных и молочных продуктов, их влияние на качество и сохраняемость продукции /И.Ю. Потороко, А.В. Паймулина, Д.Г. Ускова и др. // Вестник ВГУИТ. – 2017. – Т. 79, № 4. – С. 143–151.

25. Тишин, В. Б. Культивирование микроорганизмов: кинетика, гидродинамика, тепломассообмен / В. Б. Тишин– СПб., 2012. – 181 с.
26. Филимонова, Т.И. Определение физиологического состояния пивных дрожжей путем измерения ферментативной активности / Т.И. Филимонова // Пиво и напитки. – 2014. – № 3. – С. 22–26.
27. Филимонова, Т.И., Влияние этанольного и осмотического стресса на пивные дрожжи / Т.И. Филимонова, Е.И. Несс, О. А. Борисенко, К.В. Кобелев // Пиво и напитки. – 2012. – № 5. – С. 12–14.
28. Шестаков С.Д., Волохова Т.П. Новая эффективная технология активации хлебопекарных дрожжей. Хлебопечение России 2000, №6, - С. 33-34.
29. Angelov, A. Development of a new oat-based probiotic drink/ A. Angelov, V. Gotcheva, R. Kuncheva, T. Hristozova //International journal of food microbiology/, 112(1). – 2006, 75–80.
30. Chandler, M. Defining the ethanol – stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. A thesis submitted for the degree of doctor of philosophy In Victoria University School of Molecular Sciences, Australia. 2014
31. Changkun, L. Influence of *Lactobacillus plantarum* on yogurt fermentation properties and subsequent changes during postfermentation storage / L. Changkun, J. Song, L. Kwok, Y. Chen // Journal of Dairy Science. – 2017. – Vol. 100, № 4. – P. 5–28.
32. Costa, V. Oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*: Molecular mechanisms of ethanol and hydrogen peroxidestress responses/ Vítor Manuel Vieira da Costa Universidade do Porto. - 1998. – p.136.
33. Kubota, S. Effect of ethanol on cell growth of budding yeast: Genes that are important for cell growth in the presence of ethanol / S. Kubota, I. Takeo, K. Kume, M. Kanai, A. Shitsmukai, M. Mizunuma, T. Miyakawa, H. Shimoi, H. Iefuji, D.Hirata //Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2004. – 68. – P. 968-972.
34. Martensson, O. A fermented, ropy, non-dairy oat product based on the exopolysac-charide-producing strain *Pediococcus damnosus* / O. Martensson, J. Staaf, M. Duecas-Chasco, A. Irastorza, R. Oste, O. Holst. // Advances in Food Sciences. – 2002. – 24, P. 4–11.
35. Martensson, O. Lactic acid bacteria in an oat-basednon-dairy milk substitute: fermentation characteristics and exopolysacchar-ide formation/ O. Martensson, R. Oste, O. Holst. // Food Science and Technology/LWT – 33. – 2000. – P. 525–530.
36. Martensson, O., Andersson, C., Andersson, K., Oste, R., Holst, O., 2001. Formulation of an oat-based fermented product and its comparison withyogurt / O. Martensson, C. Andersson, K. Andersson, R. Oste, O. Holst, // Journal of the Science of Food Agriculture 81. – 2000. – P. 1314–1321.

**Протокол отчет по лабораторной работе**

ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет (НИУ)»

Кафедра «Пищевые и биотехнологии»

Дисциплина «Биотехнологические основы производства пищевых ингредиентов»

Группа \_\_\_\_\_

Студент (ы) \_\_\_\_\_

Преподаватель \_\_\_\_\_

Оценка за отчет \_\_\_\_\_

Рабочий протокол и отчет по лабораторной работе № \_\_\_\_.

Цель работы \_\_\_\_\_

Объект исследования \_\_\_\_\_.

Методы экспериментальных исследований \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



Ирина Валерьевна Калинина  
Ринат Ильгидарович Фаткуллин  
Ирина Юрьевна Потороко

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПРОИЗВОДСТВА  
ПИЩЕВЫХ ИНГРЕДИЕНТОВ**  
Учебное пособие

Техн. редактор А.В. Миних

Издательский центр Южно-Уральского государственного  
университета

---

Подписано в печать 22.02.2024. Формат 60×84 1/16. Печать  
трафаретная.

Усл. печ. л. 3,0. Тираж 100 экз. Заказ 503. Цена С.

---

Отпечатано в типографии Издательского центра ЮУрГУ.  
454080, г. Челябинск, пр. им. В.И. Ленина, 76.