

Документ подписан простой электронной подписью  
Информация о владельце:  
ФИО: Локтионова Оксана Геннадьевна  
Должность: проректор по учебной работе  
Дата подписания: 30.11.2021 10:58:59  
Уникальный программный ключ:  
Ob817ca911e6668abb13a5d426d39e5f1c11eabb73e14371b489fda563089

1

**МИНОБРАЗОВАНИЯ РОССИИ**

Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования  
«Юго-Западный государственный университет»  
(ЮЗГУ)

Кафедра товароведения, технологии и экспертизы товаров

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе  
О.Г. Локтионова  
«*ОГ*» *11* ноября 20*21* г.



**БИОКОНВЕРСИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ**

Методические указания по выполнению практических работ  
для направления подготовки  
19.04.02 «Продукты питания из растительного сырья»

Курск 2021

УДК 664

Составитель А.Е. Ковалева

Рецензент

Кандидат технических наук, доцент *Э.А. Пьяникова*

**Биоконверсия растительного сырья:** методические указания по выполнению практических работ для направления подготовки 19.04.02 «Продукты питания из растительного сырья» /Юго-Зап. гос. ун-т; сост. А.Е. Ковалева. Курск, 2021. 62 с.: Библиогр.: с.62.

Приводится перечень практических работ, краткие теоретические сведения, задания для выполнения, вопросы для подготовки, рекомендуемая литература.

Предназначены для магистров направления подготовки 19.04.02 «Продукты питания из растительного сырья» всех форм обучения.

Текст печатается в авторской редакции

Подписано в печать Формат 60x84 1/16.  
Усл. печ. л. 3,60. Уч.-изд. л. 3,26. Тираж 50 экз. Заказ. *1341* Бесплатно.  
Юго-Западный государственный университет.  
305040, г. Курск, ул. 50 лет Октября, 94.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
Правила оформления	5
Работа №1. Теоретические основы биоконверсии	5
Работа №2. Химический состав живых организмов	12
Работа №3. Получение и промышленное использование ферментов	18
Работа №4. Виды ферментов	25
Работа №5. Получение безалкогольного напитка при выращивании комплекса микроорганизмов чайного гриба	32
Работа №6. Влияние комплексных улучшителей на качество хлеба	36
Работа №7. Применение ферментных препаратов в кондитерском производстве	39
Работа №8. Биоконверсия вторичного сырья	44
Работа №9. Исследование растительного сырья	49
Работа №10. Производство этилового спирта	53
Работа №11. Изучение методов определения этилового спирта в продукции	58
Рекомендательный список литературы	62

## ВВЕДЕНИЕ

Методические указания к выполнению практических работ предназначены для студентов направления 19.04.02 «Продукты питания из растительного сырья» с целью закрепления и углубления ими знаний, полученных на лекциях и при самостоятельном изучении учебной литературы, овладения умениями и навыками самостоятельной работы.

Методические указания разработаны в соответствии с требованиями Федерального государственного образовательного стандарта. Перечень лабораторных работ, их объем соответствуют учебному плану и рабочей программе дисциплины.

При подготовке к занятиям студенты должны изучить соответствующий теоретический материал по учебной литературе, конспекту лекций, выполнить задания для самостоятельной работы, ознакомиться с содержанием и порядком выполнения лабораторной работы.

Каждое занятие содержит цель его выполнения, рекомендуемые для изучения литературные источники, вопросы для подготовки, краткие теоретические сведения, задания для выполнения работы в учебной аудитории и дома.

При выполнении практических работ основным методом обучения является самостоятельная работа студентов с высоким уровнем индивидуализации заданий под руководством преподавателя. Индивидуализация обучения достигается за счет распределения между студентами индивидуальных заданий и тем разделов дисциплины для самостоятельной проработки и освещения их на практических занятиях. Результаты выполненных каждым студентом заданий обсуждаются в конце занятий. Оценка преподавателем лабораторной работы студента осуществляется комплексно: по результатам выполненного задания, устному сообщению и качеству оформления работы, что может быть учтено в рейтинговой оценке знаний студента.

## ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ РАБОТ

1. Отчеты по каждой теме практического занятия оформляются в отдельной тетради.

2. Перед оформлением каждой работы студент должен четко написать ее название, цель выполнения, краткие ответы на вопросы для подготовки, объекты и результаты исследования. Если предусмотрено оформление работ в виде таблиц, то необходимо все результаты занести в таблицу в тетради. После каждого задания должно быть сделано заключение с обобщением, систематизацией или обоснованием результатов исследований.

3. Каждую выполненную работу студент защищает в течение учебного семестра.

Выполнение и успешная защита практических работ являются допуском к сдаче теоретического курса на зачете.

### Работа №1. Теоретические основы биоконверсии

**Цель работы:** изучить сущность биоконверсии, биологические агенты биоконверсии и их особенности.

Современное промышленное производство продуктов биосинтеза представляет собой единую биотехнологическую систему, которая складывается из последовательных стадий и операций, количество и особенности которых зависят от вида производимой продукции и ее товарной формы.

Структура и особенности биотехнологии могут охватывать отдельные операции или процесс в целом. Совершенствование биотехнологического процесса может привести к созданию новых структурных единиц и к ликвидации устаревших.

Определяющими факторами в данном случае являются:

- используемый биологический агент (объект);
- субстрат и его биохимические и биофизические характеристики;
- аппаратное оформление, включая системы контроля и управления;

- технологический режим или способ реализации;
- соответствие технологических процессов, оборудования, помещений, качества продукции и ее упаковки требованиям стандартов.

Биологическим агентом (объектом) биотехнологической системы может быть клетка (прокариот, эукариот) или вирусная частица. Субстратом является питательная среда для культивирования клеток, продуктом – биомасса клеток, вирусов или синтезируемое клетками вещество, которому при соответствующей обработке придается товарный вид. Одним из основных элементов аппаратурного обеспечения биотехнологического процесса является биореактор (аппарат-культиватор, ферментер). При определенных параметрах и режимах культивирования в биореакторах можно выращивать практически любые клетки.

Биологическими объектами (агентами) биотехнологии являются различные представители живой природы, которые делятся на три надцарства: акариоты (безъядерные), прокариоты (предъядерные) и эукариоты (ядерные) и 5 царств: вирусы, бактерии, в том числе микроскопические водоросли, грибы, а также растения и животные, в том числе простейшие.

Вирусы представляют собой бесклеточные частицы размером несколько нм и видны только в электронном микроскопе. Они являются облигатными, то есть обязательными, паразитами и могут размножаться только в клетках других организмов. Вне клеток вирусы существуют в виде вирионов, представляющих собой комплекс нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) с белком, связанных между собой нековалентными связями. Белковые молекулы, окружающие РНК или ДНК, создают оболочку вируса, называемую капсидом. По типу нуклеиновой кислоты вирусы делятся на РНК-содержащие (вирусы растений, а также возбудители гриппа, полиомиелита, СПИДа и других заболеваний) и ДНК-содержащие (бактериофаги, некоторые вирусы человека и животных, например, герпеса, оспы и другие). Наряду с типичными вирусами открыты вириды. Они представляют собой частицы, состоящие из низкомолекулярных РНК (240–400 нуклеотидов), и не содержащие капсидов.

Бактерии представляют собой безъядерные, одноклеточные (как правило) организмы, размером 0,2–10,0 мкм и имеющие определенную форму (палочки, кокки, спиралевидные формы и т. д.). Внутреннее содержимое бактериальной клетки (цитоплазма) изолировано от внешней среды клеточной оболочкой, состоящей из тонкой мембраны стенки, на которую приходится до 20 % сухого вещества бактерий. Клеточная стенка имеет сложное строение и придает бактериальной клетке определенную форму. Исключения составляют микоплазмы, у которых нет клеточной стенки и, соответственно, определенной формы. Бактериальные клетки, лишенные клеточной стенки называются протопластами. Протопласты используются в клеточно-инженерных исследованиях. Бактерии отличаются чрезвычайным разнообразием по условиям обитания, приспособляемости, способам питания и биоэнергетического обмена, а также по отношению к макроорганизмам – животным и растениям. Среди них выделяют наиболее древние формы, археобактерии, способные жить в экстремальных условиях. Так, для галобактерий, обнаруженных в морских солевых растворах, оптимальной средой обитания является концентрированный раствор поваренной соли (3,5–5,0 моль/л). Термоацидофильные бактерии способны жить в горячих источниках, на склонах вулканов и в терриконах угольных шахт при pH 1–3 и температурах 59–105 °С. Эубактерии являются более чувствительными к условиям окружающей среды. Многие из них способны паразитировать в многоклеточных организмах и вызывать болезни человека, животных и растений. Болезнетворные микроорганизмы называются патогенными. Например, все известные микоплазмы являются патогенными. Паразиты бывают облигатными и факультативными. Облигатные паразиты не могут обитать вне организма. К ним относятся, в частности, возбудители сифилиса и гонореи. Факультативные (необязательные) паразиты, например, синегнойная палочка или вульгарный протей, обитающие во внешней среде, при снижении защитных сил организма могут вызвать инфекцию. Неболезнетворные бактерии, способные обитать на слизистых оболочках и кожных покровах, но не питающиеся «живым белком» называются сапрофитами. Благодаря большому разнообразию бактерий, обладающих широким диапазоном биохимического состава и своеобразием протекающих в них реакций, бактерии наи-

более часто служат биотехнологическими объектами. Из биомассы бактерий получают различные органические вещества, в частности, аминокислоты, белки, в том числе ферменты. Бактерии являются удобным объектом для генетических исследований, так как быстро размножаются и содержат плазмидную ДНК, способную включать в свой состав чужеродные фрагменты. Генетически модифицированные и иммобилизованные на носителях клетки бактерий используются в научно-исследовательских и промышленных целях. Наиболее изученной и широко применяемой в генноинженерных исследованиях клеткой является кишечная палочка, обитающая в толстом кишечнике человека.

Грибы, насчитывающие десятки тысяч видов, сочетают в себе черты клеток растений и животных. Они имеют клеточное ядро, как и растения – прочную клеточную стенку; аналогично клеткам животных они нуждаются в некоторых витаминах и способны синтезировать свойственные животным полисахариды: хитин и гликоген. Наибольший интерес для биотехнологии представляют микроскопические грибы, к которым относятся дрожжи, применяемые в хлебопечении, пивоварении и в молочной промышленности, а также плесневые грибы и другие микроорганизмы. Грибы, в частности, плесени, широко используются в качестве продуцентов для получения спиртов, органических кислот, антибиотиков, ферментов, различных биологически активных веществ и кормового белка. Самостоятельную группу организмов, представляющих собой симбиоз (сожительство) грибов с водорослями или с цианобактериями, составляют лишайники, которые являются перспективными источниками ряда биологически активных веществ.

Растения, насчитывающие около 500 000 видов, состоят из ядерных клеток, которые имеют сложное строение и выполняют различные специализированные функции. К ним относятся водоросли, являющиеся водными организмами, и высшие растения, обитающие преимущественно на суше. Водоросли отличаются от высших растений тем, что не имеют органов и тканей, а представляют собой слоевища, состоящие из недифференцированных (одинаковых) клеток. Как и другие растения, водоросли обладают способностью к фотосинтезу и богаты различными углеводами и пигментами. Один из видов водорослей – морская капуста использует-

ся в пищу. Из водорослей добывают агар-агар и альгинаты – полисахариды, используемые для изготовления микробиологических сред и в пищевой промышленности.

Высшие растения – многоклеточные организмы, имеющие специализированные органы, такие как корни, стебли, листья. Они состоят из тканей, образованных дифференцированными клетками. Ткани различаются химическим составом, строением и выполняют различные функции: механические, покровные, выделительные, проводящие и другие. Особое значение для биотехнологии имеет одна из тканей растений, называемая меристемой. Клетки меристемы способны к делению, благодаря чему осуществляется рост, а также образование тканей и органов растений. Они не утрачивают способности делиться и после удаления из растения. При выращивании на специальных питательных средах меристемные клетки дают массу делящихся клеток – каллус, который можно длительно культивировать, получать из него новые растения или использовать для извлечения нужных веществ. Наиболее сложным, но в то же время и неизмеримо более эффективным, является выращивание отдельных растительных клеток в жидких средах (в суспензионных культурах). Благодаря способности растений улавливать световую энергию солнца и использовать ее в синтезе органических веществ, растения служат поставщиками питательных веществ для других организмов. Растения составляют большую часть биомассы Земли, поэтому производство и переработка растительного сырья для удовлетворения различных потребностей человека используется с древнейших времен. Являясь богатейшими и незаменимыми источниками разнообразных углеводов, липидов, витаминов и многих других физиологически активных и лекарственных веществ, растения служат прежде всего для их получения. При этом до настоящего времени, несмотря на выдающиеся достижения биотехнологии, используются традиционные способы извлечения биогенных соединений: экстракция, перегонка, фильтрация. Однако все большую роль приобретают технологии получения биологически активных веществ из клеточных культур (биостимуляторы из женьшеня, противораковое средство таксол из коры тиса и др.), а также производство продуктов из генетически модифицированных растений.

Животные бывают простейшими – одноклеточными и высшими – многоклеточными. Как и растения они состоят из ядерных клеток. Среди простейших имеются паразиты и возбудители болезней высших животных и человека. Культивирование их на искусственных средах чрезвычайно затруднено. Однако некоторые простейшие выращиваются и используются для целей биоиндикации, в токсикологических исследованиях и для получения отдельных веществ. Ткани высших животных являются источниками полноценного белка, липидных веществ и некоторых витаминов, необходимых для питания человека. Из органов и крови животных получают различные белковые препараты (альбумин, иммуноглобулины, ферменты), некоторые гормоны и другие биологически активные вещества. Поскольку сырье животного происхождения является наиболее дорогим, а выход конечных продуктов недостаточно высок, то в современных технологиях все чаще используются культуры клеток животных или человека, выращиваемых на искусственных средах (получение интерферона, моноклональных антител). Наиболее перспективным и экономичным способом производства биологически активных веществ является генная инженерия, позволяющая внедрить ген животного в клетку бактерии, которая начинает синтезировать нужное вещество. Так получают в настоящее время человеческий инсулин – гормон белковой природы, без которого невозможен нормальный обмен веществ, гормон роста и некоторые другие вещества.

Клетки растений и животных являются сложно организованными образованиями, состоящими из цитоплазмы и более плотного ядра. В цитоплазме содержатся внутриклеточные органеллы: митохондрии, рибосомы и лизосомы, шероховатые и гладкие мембраны эндо-плазматической сети, погруженные в водорастворимую среду клетки – цитозоль. Клетка окружена плазматической мембраной, обладающей избирательной проницаемостью благодаря наличию специальных механизмов транспорта веществ. Клеточные ядра служат для хранения генетической информации, носителем которой является ДНК.

Митохондрии снабжают клетку энергией за счет окисления веществ при участии кислорода. В них синтезируются также собст-

венные белки митохондрий. Это – исключение из общего правила. Все остальные клеточные белки синтезируются на рибосомах.

Лизосомы содержат ферменты для расщепления различных биополимеров.

Мембраны эндоплазматической сети формируют внутреннюю структуру (каркас) клетки, на них осуществляются превращения внутриклеточных веществ, а также реакции обезвреживания чужеродных соединений (ксенобиотиков).

С мембранами эндоплазматической сети связан аппарат Гольджи, представляющий собой систему микротрубочек. В аппарате Гольджи происходят реакции химической модификации белков, а также синтез резервных и секретируемых из клетки веществ.

Жидкая часть клетки – цитозоль содержит ферменты синтеза и анаэробного окисления веществ, а также низкомолекулярные органические и неорганические соединения.

Особенностью строения растительных клеток является наличие хлоропластов, в которых происходят процессы фотосинтеза. От клеток животных растительная клетка отличается также твердой стенкой, в состав которой входят вещества полисахаридной природы (целлюлоза, гемицеллюлозы, пектины) и полифенольный полимер лигнин.

Практически все биотехнологические процессы тесно связаны с жизнедеятельностью различных групп микроорганизмов – бактерий, вирусов, дрожжей, микроскопических грибов. Микроорганизмы потребляют из окружающей среды вещества, растут, размножаются, выделяют жидкие и газообразные продукты метаболизма, тем самым реализуя те изменения в системе (накопление биомассы или продуктов метаболизма, потребление загрязняющих веществ), ради которых проводят процесс культивирования. Следовательно, микроорганизм можно рассматривать как центральный элемент биотехнологической системы, определяющий эффективность ее функционирования.

### **Задания**

Изучите внимательно теоретические сведения и дополнительную литературу и ответьте письменно на ниже представленные вопросы.

### Вопросы:

1. Что такое биоконверсия?
2. Что является биологическими агентами биоконверсии?
3. Что собой представляют бактерии и где они используются?
4. Бактерии, как биологические агенты биоконверсии.
5. Какова роль биоконверсии в жизни человека?

### Работа №2. Химический состав живых организмов

**Цель работы:** изучить химический состав живых организмов и физиологические функции важнейших химических элементов

#### Краткие теоретические сведения

В живой природе содержатся более 60 химических элементов, относящихся преимущественно к легким элементам таблицы Менделеева. Они делятся на макроэлементы (O, C, H, Ca, N, P, S, Mg, Na, K, Cl, Fe), содержание которых превышает одну тысячную процента от общего состава, микроэлементы (Mn, Zn, Cu, B, Se, Mo, Co, Ni), на долю которых приходится от одной тысячной до одной миллионной процента, и ультра-микроэлементы (Hg, Au, U, Ra и др.), концентрация которых в живой материи составляет менее одной миллионной доли процента. Основную массу живой материи составляют следующие химические элементы (в %): кислород – 65, углерод – 18, водо-род – 10, азот – 3,0, кальций – 2,0, фосфор – 1,1, калий – 0,35, сера – 0,25.

Из них только кислород и кальций в больших количествах содержатся в земной коре. Кремний, алюминий и железо, также содержащиеся в высоких концентрациях в неорганической природе, в живых организмах встречаются значительно реже. Вероятно, это объясняется тем, что большинство из веществ, составляющих живую материю, образуют легко растворимые и газообразные вещества, что делает их более доступными для ассимиляции организмами. Второй особенностью перечисленных элементов является их

способность образовывать кратные связи, что значительно увеличивает возможность синтеза разнообразных соединений, обладающих уникальными свойствами и функциями. Наиболее ярким примером таких биогенных соединений, синтез которых невозможен вне живой структуры, служат макроэргические вещества (АТФ, ГТФ, креатинфосфат и другие), в химических связях которых содержится необычно высокий запас энергии, используемой затем для реакций синтеза, мышечного сокращения и других процессов жизнедеятельности. Наконец, отмечена зависимость между биологической ролью химических элементов и их положением в системе Д.И. Менделеева. Как правило, при переходе от легких к тяжелым элементам в пределах одной и той же подгруппы возрастает токсичность элементов и, соответственно, снижается их содержание в биомассе (Zn, Cd, Hg). Однако, некоторые тяжелые металлы (Fe, Co, Ni), содержащиеся в небольших количествах в биологически активных соединениях, участвуют в жизненно важных биологических функциях (транспорт кислорода, процессы окисления, кроветворение, каталитические реакции).

Перечень главных физиологических функций важнейших элементов приведен в таблице 1.

Таблица 1 - Физиологические функции важнейших химических элементов

Химический элемент	Физиологическая роль
H <sub>2</sub>	Входит в состав воды и органических веществ клетки
O <sub>2</sub>	Входит в состав воды и органических веществ клетки, служит акцептором электронов при аэробном дыхании
C, N	Входят в состав органических веществ клетки, белков, нуклеиновых кислот, коферментов
S	Входит в состав белков и некоторых коферментов (кокарбоксилаза)
P	Входит в состав нуклеиновых кислот, фосфолипидов, коферменты
K	Один из главных неорганических катионов клетки, кофактор для некоторых ферментов
Mg	Важный катион клетки, неорганический кофактор для ферментных реакций, в том числе и для реакции с участием АТФ, участвует в связывании ферментов с субстратами, входит в состав хлорофиллов

## Продолжение таблицы 1

Химический элемент	Физиологическая роль
Mn	Неорганический кофермент для некоторых ферментов, может заменить Mg
Ca	Важный катион клетки, кофактор для некоторых ферментов (протеаз)
Fe	Входит в состав цитохромов и других белков, кофактор для некоторых ферментов
Co	Входит в состав витамина B <sub>6</sub> и его производных, служащих коферментами
Cu, Zn, Mo	Неорганические компоненты некоторых ферментов

Совокупность веществ, входящих в состав живых организмов, насчитывающих более 2 млн. видов, формирует биомассу Земли, составляющую, в пересчете на сухое вещество, более  $10^{12}$  тонн. При этом ежегодно обновляется примерно 10 % от этого количества. В среднем 75 % от всей биомассы приходится на воду. Однако, содержание воды в разных живых объектах широко варьирует: от 5–15 % в семенах растений до 40–60 % в древесине и до 99 % в ткани медуз. Содержание органических веществ в сухом веществе биомассы составляет в среднем 90 %; из них около 50 % приходится на белки, примерно 40 % – на углеводы, нуклеиновые кислоты, липиды и другие низкомолекулярные органические вещества. В разных живых объектах соотношение между разными классами органических веществ различно. Так, в микроорганизмах и в тканях животных преобладают белки (таблица 2), а в растениях – углеводы. Однако, содержание органических веществ даже в разных тканях одного организма различно. Так, концентрация белка в семенах сои может достигать 45 %, а в корнях и плодах растений содержание углеводов доходит до 70–90 % от их сухой массы.

Таблица 2 - Химический состав клеток живых организмов

Компоненты	Кишечная палочка, %	Клетки млекопитающих, %
Вода	70	83
Белки	15	10–20
Углеводы	3	1–5
Липиды	2	1–2
ДНК	1	0,3
РНК	6	0,7

Примерно 10 % сухой биомассы представлены минеральными веществами. Наиболее важными из них являются кальций, фосфор, натрий, калий и железо, а также их соединения. Они входят в состав сложных белков, участвуют в нервной проводимости и в работе мышц, в ферментативных реакциях, выполняя роль активаторов или кофакторов, поддерживают осмотическое давление в клетках и тканях. У человека и животных до 4 % сухого вещества приходится на кальций. Он содержится в двух формах, выполняющих разные функции. Большая часть кальция содержится в костной ткани в виде фосфорно-кальциевых кристаллов, формирующее цементующее вещество. Часть кальция находится в несвязанной ионизированной форме. Свободный кальций необходим для передачи нервных импульсов, мышечного сокращения, свертывания крови, реализации действия гормонов. Всасывание кальция в желудочно-кишечном тракте, выделение почками, а также его внутриклеточная концентрация строго регулируется. Суточная потребность человека в кальции составляет в среднем 800 мг. Главными источниками кальция в питании человека являются молоко и молочные продукты. Он хорошо усваивается также в составе солей:  $\text{CaCO}_3$ , глюконат и лактат кальция. Содержание натрия и калия в тканях составляет, соответственно, 1,04 и 0,4 %. Большая часть натрия находится во внеклеточных жидкостях, а калия внутри клеток. Они играют важную роль в регуляции осмотического давления и кислотно-основного равновесия, оказывая подщелачивающее действие. Их источниками являются преимущественно продукты растительного происхождения. Человек за сутки получает в среднем 12 г поваренной соли, в том числе 8 г в составе пищевых продуктов и около 4 г за счет подсаливания. У 1/3 людей, имеющих генетическую предрасположенность к гипертонической болезни, избыточное потребление поваренной соли способствует повышению артериального давления, но в общей массе % таких людей невысок. Железо, на долю которого приходится в среднем 0,01 % от сухого вещества тканей, в составе гемоглобина участвует в транспорте кислорода эритроцитами и, входя в состав миоглобина – в депонировании кислорода в мышцах. Будучи составной частью цитохромов и некоторых ферментов, он принимает участие также в процессе тканевого дыхания и в окислительно-восстановительных реакциях. Суточная

потребность человека в железе составляет в среднем 10 мг. Он лучше всего усваивается из продуктов животного происхождения, богатых гемовым железом. Хорошими источниками этого элемента являются также сульфат, глюконат и фумарат железа.

Элементы питания, необходимые для роста клеток в производстве биотехнологического продукта, можно подразделить на следующие группы:

- источники основных элементов;
- источники элементов, требуемых в меньших количествах;
- аминокислоты;
- витамины и гормоны;
- источники микроэлементов.

Основные источники питания, функции в биосинтезе и их обеспечение для клеток приведены в таблице 3.

Таблица 3 - Элементы питания клеток, применяемые в биотехнологическом производстве

Элемент	Источник их получения	Функция
Основные элементы питания		
H <sup>+</sup>	Кислота или щелочь	Интенсивность роста. Состав биомассы и морфология
O <sub>2</sub>	Воздух, вода	Акцептор электронов или водорода (дыхание), катаболизм
C	Глюкоза, мальтоза, лактоза	Энергия роста, функция поддержания жизнедеятельности и построения клеток
N <sub>2</sub>	Неорганические и органические соединения, глутамат	Синтез белка, нуклеиновых кислот и полимеров клеточной стенки
Элементы питания, требуемые в меньшем количестве		
P	Неорганические фосфаты	Синтез белка, нуклеиновых кислот и полимеров клеточной стенки, катаболизм
K	Неорганические соединения	РНК, скорость роста
S	Сульфат, цистеин, метионин	Синтез аминокислот
Аминокислоты		
Глутаминовая кислота, L - аминокислоты,	Пептиды, гидролизаты, пептоны и т.п.	Фактор роста, синтез белка, клеточные стенки бактерий, ингибитор роста

## Продолжение таблицы 3

Элемент	Источник их получения	Функция
D - аминокислоты		
Витамины и гормоны		
Жирорастворимые и водорастворимые витамины	Биотин, фолиевая кислота, пантотеновая кислота, тиамин, никотиновая кислота, никотинамид, пиридоксин, мезинозит, холин	Фактор роста
Микроэлементы		
Ca, Cu, Fe, Mg, Zn, Co, Mo	Соли, неорганические соединения	Интенсивность роста

При недостатке в субстрате каких-либо элементов в клетках могут включаться «запасные» механизмы биохимических процессов, направленные на выживаемость популяции.

Следует отметить, что используемые в биотехнологии субстраты и получаемые продукты чрезвычайно многообразны и предназначены для специфического применения. В таблице 4 приведены примеры субстратов, используемых в производстве фармацевтических биопрепаратов.

Таблица 4 - Основные субстраты, используемые в производстве биопрепаратов, и получаемые продукты

Субстрат	Биологический объект	Конечный продукт
Синтетические и полусинтетические среды	Клетки микроорганизмов, животных и растений	Диагностические препараты
Гидролизаты растительных полимеров	Вирусы, бактериофаги	Лечебные, бактериальные и вирусные препараты
Продукты – предшественники биотрансформации	Компоненты клеток: протопласты мембран, хлоропласты, ферменты	Моноклональные антитела, сыворотки, глобулины, бактериофаги и пр.
Сыворотки. Химические вещества	Иммобилизованные клетки микроорганизмов, животных, их компоненты и внеклеточные продукты	Диагностические и лечебные препараты
Отходы( в том числе сельского хозяйства)	Продукты животноводства и растениеводства	Питательные среды, кормовые добавки, корма

### **Задания**

Изучите теоретические сведения и дополнительную литературу и ответьте письменно на ниже представленные вопросы.

#### **Вопросы:**

1. Как делятся все жизненно важные элементы?
2. Что относится к макроэлементам, и какова их роль для человеческого организма?
3. Что относится к микроэлементам, и какова их роль для человеческого организма?
4. Назовите элементы питания, необходимые для роста клеток в производства биотехнологического продукта.
5. Какие продукты являются источником витаминов группы В?
6. Какие продукты являются источником витамина С? Какова его роль в жизни человека?
7. Какие продукты являются источником калия? Какова его роль жизни человека?
8. Какие продукты являются источником кальция? Какова его роль в жизни человека?
9. Какие продукты являются источником серы? Какова ее роль в жизни человека?
10. Какие продукты являются источником фосфора? Какова его роль в жизни человека?
11. Опишите технологию получения одного из биопрепаратов.

### **Работа №3.**

#### **Получение и промышленное использование ферментов**

**Цель работы:** изучить сущность получения и сферы применения ферментов.

#### **Краткие теоретические сведения**

Все биохимические реакции, протекающие в живых организмах, катализируются ферментами, являющимися по своему строе-

нию белками. Их второе равнозначное название – энзимы, а отрасль науки, изучающая ферменты, называется энзимология. Следовательно, ферменты или энзимы – это специализированные белки, содержащиеся в клетках и внеклеточных жидкостях микроорганизмов, растений и животных. Они участвуют в реакциях расщепления белков, липидов и полисахаридов в желудочно-кишечном тракте, в процессах внутриклеточного обмена веществ, в образовании и выведении из организма конечных продуктов обмена, в энергетических процессах, в обезвреживании токсических веществ, в синтезе клеточных белков и других биогенных соединений, необходимых для жизнедеятельности.

Ферментативные процессы применяются с доисторических времен во всех сферах деятельности человека. Виноделие и пивоварение, сыроварение и получение соевых продуктов, лечение нарушений пищеварения и выделка кож – наиболее характерные примеры использования ферментов. Источниками ферментов служат ткани растений, животных и культуры микроорганизмов. Так, трипсин, вырабатываемый в поджелудочной железе (*pancreas*) человека и животных также комплекс протеолитических ферментов поджелудочной железы (панкреатин) применяются при болезнях органов пищеварения и в переработке мясных продуктов. Сычужный фермент (ренин), содержащийся в слизистой оболочке желудка теленка, необходим для выработки сыра. Из растений получают ферменты, расщепляющие белки (протеазы), которые используются в мясоперерабатывающей промышленности. Применение ферментов в химических и пищевых технологиях обусловлено их специфичностью, а также высокой активностью при проведении реакций в мягких условиях и отсутствием побочных продуктов реакций.

Началом промышленной энзимологии считается 1890 г., когда было освоено производство амилазы из гриба *Aspergillusoryzae*, расщепляющей  $\alpha$ -1,4-гликозидные связи в крахмале. Препарат под названием такадиастаза, содержащий, наряду с амилазой примесь протеазы, применялся в качестве средства, улучшающего пищеварение. Производство и использование ферментов в промышленных целях началось в XX в. В 1913 г. в странах Западной Европы получило применение средство для замачивания белья, содержащее соду и протеолитические ферменты поджелудочной железы: трипсин

и химотрипсин. Подлинным переворотом в прачечной технологии, в середине XX века, явилось использование протеазы, получаемой из *Bacillus subtilis*, для замачивания и стирки белья. Добавление к стиральному порошку 0,5 % ферментного препарата, содержащего всего 3 % активного фермента, позволяет решить проблему отстирывания белковых пятен, благодаря тому, что протеаза с высоким сродством концентрируется именно на белковых пятнах. Со второй половины XX века производятся сотни тонн очищенных ферментов различного назначения. Около половины получаемых ферментных препаратов приходится на протеазы. Постоянно расширяются их ассортимент и сфера применения. Протеазы используются для умягчения мяса и увеличения выхода качественных мясных продуктов, створаживания молока и производства новых молочных продуктов, для предотвращения холодного помутнения пива и расщепления клейковины муки, а также для получения белковых гидролизатов и смесей аминокислот пищевого и медицинского назначения.

По строению активного центра протеазы делят на тиоловые, сериновые, аспартатные (кислые) и металлоферменты. Ряд тиоловых ферментов, применяемых для повышения физико-химических и качественных показателей мясных изделий, выделяют из растительного сырья. К ним относятся папаин из плодов дынного дерева, бромелаин из стеблей и листьев ананаса, а также фицин из растений рода *Ficus*. Перечисленные ферменты отличаются дороговизной, поскольку их продуцентами являются тропические растения. Вследствие этого в мясное производство все больше внедряются кислые протеазы, синтезируемые грибами, и похожие по свойствам на пепсин и ренин. Кислые протеазы применяются и в других отраслях пищевой промышленности. В частности, в хлебопекарном производстве – для расщепления клейковины муки с целью получения мягкого эластичного теста, идущего на изготовление бисквитов. В пивоварении они используются для предотвращения помутнения пива при его охлаждении. Кислые протеазы створаживают молоко, но они не могут заменить ренин при выработке сыра, так как вызывают глубокий гидролиз казеина; тем не менее, некоторые из них используются для створаживания молока и производства некоторых сортов сыра. В странах Индокитая с их помощью гидроли-

зуют белки сои и готовят соевые соусы. Кислые протеазы применяются также в кожевенной промышленности для удаления шерсти и выделки мягких, эластичных кож.

Сериновые протеазы, характеризующиеся низкой специфичностью и широким оптимумом действия, чаще всего используют в качестве действующего начала в стиральных порошках. Из них в наибольших количествах (более 500 т в год) вырабатывается субтилизин *Carlsberg*. Разработаны технологии получения сериновых протеаз из алкилофильных микроорганизмов, которые активны при рН 9–12 и температуре выше 50 °С. Отличительной особенностью сериновых протеаз является то, что они не гидролизуют белки до отдельных аминокислот. Ограничением для их применения в пивоварении является то, что они инактивируются сериновым ингибитором солода. Более высокой избирательностью действия по сравнению с сериновыми протеазами обладают металлоферменты, в активном центре которых обычно содержится цинк. Они используются для различных целей наряду с бромелаином и папаином, в том числе для гидролиза белков ячменя при осветлении пива.

Для выделки сыра необходима специфичная протеаза (ренин или сычужный фермент), расщепляющая одну пептидную связь в казеине. Традиционно этот фермент вырабатывается из слизистой оболочки желудка телят. В связи с труднодоступностью и дороговизной сырья в течение длительного времени шли поиски заменителя ренина. Однако, ни одна из известных протеаз, в том числе микробного происхождения не отвечала требованиям сыроделов. Только в последнее время удалось получить ренин методом генной инженерии, путем внедрения рекомбинантной ДНК, содержащей ген сычужного фермента теленка, в *E. coli*.

Более 25 % производимых путем биотехнологии ферментов являются гликозидазами, катализирующими расщепление различных поли- и олигосахаридов. Они применяются для гидролиза (осахаривания) крахмала, расщепления сахарозы и лактозы с целью получения моносахаридов и безлактозных продуктов, а также на разных стадиях производства пива. Для полного расщепления крахмала применяется пуллуланаза, катализирующая разрыв  $\alpha$ -1,6-гликозидных связей амилопектина в точках ветвления. Ферменты бактерий, способные катализировать гидролиз  $\beta$ -гликозидных свя-

зей в клетчатке, применяются в переработке сельскохозяйственной продукции, что увеличивает выход пищевых углеводов.

Около четверти от общего количества вырабатываемых промышленностью ферментов, представлены энзимами разных классов, которые применяются в разных отраслях промышленности, в лечении и диагностике заболеваний, а также в генноинженерных исследованиях. Производство глюкозооксидазы позволило создать простые автоматические анализаторы для определения глюкозы в крови, что имеет жизненно важное значение для больных сахарным диабетом. Другие окислительно-восстановительные ферменты (дегидрогеназы) также используются для аналитического определения различных веществ в биологических жидкостях и тканях. В химическом синтезе используется свойственная энзимам стереохимическая специфичность, то есть способность «узнавать» и катализировать превращение только одного (*L* или *D*) оптического изомера из рацемической смеси веществ. С помощью рацемаз разделяют оптические изомеры углеводов, аминокислот и других органических веществ, что чрезвычайно трудно осуществить физико-химическими методами.

Объем продаж ферментов на мировом рынке составляет сотни миллионов долларов в год, при этом их производство ежегодно возрастает на 10–15 %. Ферменты получают из сырья растительного и животного происхождения, однако наиболее дешевым и технологичным источником ферментов являются микроорганизмы. В них найдено около половины из более 3000 открытых к настоящему времени ферментов, при этом на долю ферментных белков приходится до 5 % от общего количества содержащихся в микроорганизмах белковых веществ.

Основные этапы получения ферментов из микроорганизмов следующие: культивирование продуцентов в питательной среде в течение 1–7 суток, выделение клеток путем центрифугирования и их отмывание, дезинтеграция (разрушение) клеток, центрифугирование цитозоля, выделение ферментов из надосадочной жидкости путем высаливания и гельфльтрации, очистка от низкомолекулярных примесей путем диализа, высушивание, контроль активности и фасовка. Поскольку получение очищенных ферментов довольно трудоемкий процесс, иногда в технологических процессах исполь-

зуют целые микробные клетки, содержащие необходимые ферменты.

Наиболее эффективным является применение иммобилизованных ферментов. Иммобилизация, то есть фиксация молекулы фермента на неподвижной матрице, значительно, в десятки тысяч раз, увеличивает стабильность фермента и срок его активности, что позволяет многократно или непрерывно в течение длительного времени использовать ферментный препарат. Иммобилизация осуществляется путем присоединения молекул ферментов к носителю за счет ионных, адсорбционных взаимодействий посредством ковалентной связи или включением их в гелевые, волокнистые структуры, в микрокапсулы, липосомы. Носителями могут служить различные полимерные материалы, силикагель, оксиды металлов, целлюлоза и другие полисахариды, а также стекло и керамика. Иммобилизуют не только очищенные ферменты, но и целые или частично разрушенные микробные клетки, что экономически более выгодно.

Технологический процесс с участием иммобилизованных ферментов проводят, как правило, в проточных реакторах (колоннах), в которых катализатор функционирует в виде неподвижной фазы или в перемешиваемом слое. С помощью иммобилизованных клеток *E. coli*, содержащих аспарат-аммиак-лиазу, синтезируют аспарагиновую кислоту. Аналогичным методом получают глутаминовую кислоту, треонин, лизин и другие аминокислоты, органические кислоты и их оптические изомеры, а также лекарственные препараты, в частности, стероидные гормоны, антибиотики и другие биогенные вещества.

Ферменты сохраняют свои уникальные свойства (эффективность, специфичность действия) и вне клеток, поэтому ферментные препараты широко применяют в практических целях. Биологические катализаторы нетоксичны, работают в мягких условиях, в качестве субстратов используется доступное сырье, в том числе и отходы. В связи с этим применение ферментов в промышленности выгодно с экономической и экологической точек зрения.

По объему продуктов биотехнологических производств ферментные препараты занимают третье место после аминокислот и антибиотиков. Из нескольких тысяч известных в настоящее время

ферментов наиболее широко в промышленности используются гидролитические ферменты: амилазы, протеазы, пектиназы и целлюлазы.

В этой группе препаратов относятся  $\alpha$ - ,  $\beta$ -амилазы и глюкоамилаза. Их используют для гидролиза крахмала и гликогена. В процессе гидролиза сначала образуются более простые полисахариды - декстрины, а в последующем – глюкоза. При этом  $\alpha$ -амилаза гидролизует без определенного порядка  $\alpha$ -1,4-глюкозидные связи с образованием декстринов, мальтозы и глюкозы,  $\beta$ -амилаза отщепляет остатки  $\beta$ -мальтозы, а глюкоамилаза – остатки глюкозы от концевых частей молекул полисахарида.

Наиболее широкое применение эти препараты нашли в пищевой промышленности (производство патоки и глюкозы).

### **Задания**

Изучите теоретические сведения и дополнительную литературу и ответьте письменно на ниже представленные вопросы.

### **Вопросы**

1. Что такое ферменты?
2. В каких сферах деятельности человека применяются ферментативные реакции?
3. Что собой представляют сериновые протеазы, и где они применяются?
4. Что собой представляют тиоловые протеазы, и где они применяются?
5. Что собой представляют гликозиды, и где они применяются?
6. В чем заключаются особенности всех ферментов?
7. Что собой представляют иммобилизованные ферменты, и где они находят применение?
8. По изученной теме составьте кроссворд из не менее 20 вопросов.

## **Работа №4. Виды ферментов**

**Цель работы:** изучить основные виды ферментных препаратов и их действие.

### **Краткие теоретические сведения *Протеолитические ферментные препараты***

Эта группа ферментов относится к гидролазам. Они обладают такой важной особенностью, как высокоселективное воздействие на некоторые пептидные связи белковых молекул и пептидов. Например, пепсин способствует гидролизу пептидных связей с остатками ароматических аминокислот, трипсин катализирует гидролиз пептидной связи между остатками аминокислот аргинина и лизина. Ферментов, входящих в этот класс, очень много. Их классифицируют, в основном, по способности проявлять максимум ферментативной активности в определенной области рН раствора. Кислые протеазы проявляют максимум активности в интервале рН раствора от 1,5 до 3,0, нейтральные – 6,5 – 7,5, щелочные – от 8,0 и выше.

Протеазы нашли свое применение в различных отраслях народного хозяйства: в пищевой и легкой промышленности (предварительная обработка свежего сырого мяса и шкур, животных в кожевенной промышленности), в химической промышленности при получении синтетических моющих средств с добавками протеолитических ферментных препаратов, в здравоохранении при лечении некоторых воспалительных процессов, ожогов, тромбозов.

### ***Пектолитические ферментные препараты***

Пектолитические ферментные препараты используются для расщепления пектиновых веществ, содержащихся в стеблях растений (льна), в различных корнеплодах, фруктах. К ним относятся пектин, пектиновые кислоты и протопектин.

*Пектиновая кислота* – это полимер галактуроновой кислоты. *Пектин* – это полностью или частично этерифицированная метиловым спиртом пектиновая кислота.

*Протопектин* представляет собой комплекс с целлюлозой и белковыми веществами. Строение комплекса пока полностью не ус-тановлено. Пектиновые вещества имеют молекулярную массу от 20 до 200 кДа.

Пектиназы делятся на две группы – гидролазы и трансэлиминазы. Первые катализируют процесс отщепления метоксильных групп (пектинэстераза) или обеспечивают разрыв  $\alpha$ -1,4-гликозидных связей (полигалактуроназы). Вторые осуществляют негидролитическое расщепление пектиновых веществ с образованием двойных связей (пектинтрансэлиминазы).

Препараты нашли свое применение в легкой промышленности при вымачивании льна и в пищевой промышленности для осветления вин и консервирования фруктовых соков.

### ***Целлюлолитические ферментные препараты***

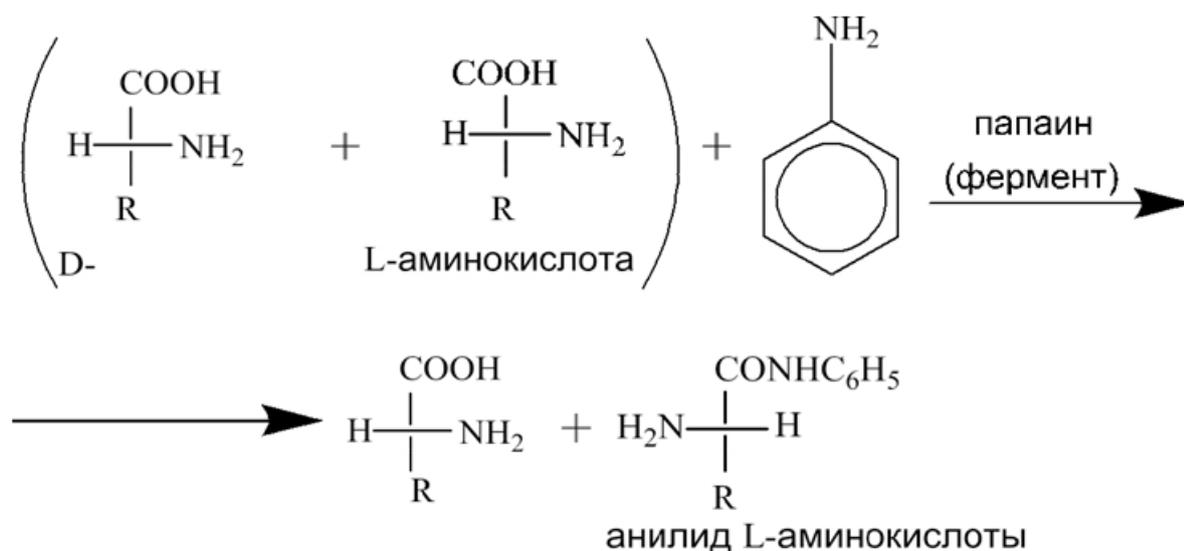
Целлюлолитические ферментные препараты используются при обработке целлюлозы. Сама целлюлоза или клетчатка представляет собой полисахарид общей формулы  $(C_6H_{10}O_5)_n$  и содержится в клеточных стенках растений. При степени полимеризации  $n = 10$  образует кристаллическую решетку. Нитевидные молекулы, взаимодействуя между собой, образуют прочные структуры – фибриллы. В объеме таких фибрилл существуют упорядоченные кристаллические участки, где молекулы расположены параллельно друг другу и связаны водородными связями. Существуют также аморфные участки с неупорядоченной структурой.

Микроорганизмы способны синтезировать целый комплекс целлюлолитических ферментов, которые последовательно катализируют процесс гидролиза целлюлозы до глюкозы. В ферментном комплексе различают три группы ферментных препаратов: *Ci*-фактор, *Sx*-фермент и целлюбиазу.

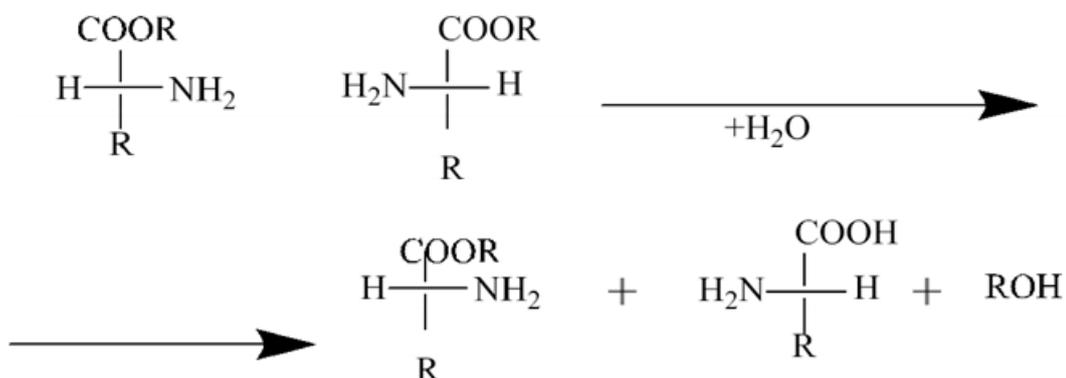
Целлюлолитические ферментные препараты нашли применение в целлюлозно-бумажной промышленности, медицинской промышленности (получении лекарственных веществ – стероидов из растений), в пищевой промышленности (при производстве растительных масел) и в сельском хозяйстве (в качестве добавок к кормам жвачных животных).

На коммерческий уровень поставлено ферментативное разделение рацемических смесей аминокислот и эфиров терпенов. Такие смеси образуются при химическом синтезе, и разделение их по оптическим свойствам составляющих имеет важное практическое значение. Известно, что для этого можно использовать традиционные физико-химические и химические методы (хроматография; механическое разделение, избирательное взаимодействие энантиомеров с другими оптически активными веществами), но гораздо более эффективными и удобными оказываются процессы, основанные на стереоспецифичности ферментов. Рассмотрим некоторые из используемых приемов.

1. Избирательное ацилирование аминов *L*-аминокислотами под действием ферментов папаина, бромелаина или фицина по приведенной ниже схеме:



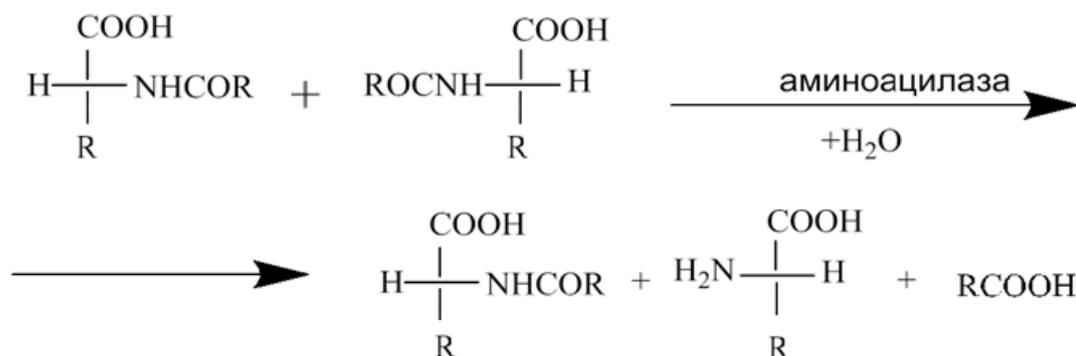
2. Образующийся анилид *L*-аминокислоты нерастворим в воде и может быть легко отделен от *D*-изомера, а затем гидролизован. Асимметричный гидролиз. В этом случае осуществляется стереоспецифический гидролиз производных аминокислот, в результате которого образуется только один энантиомер. Эфиры *L*-аминокислот гидролизуют с помощью протеолитических ферментов, например, химотрипсина:



Затем нужный продукт и не вступающие в реакцию *D*-эфиры разделяют по их растворимости в воде.

3. Использование амидаз. Эти ферменты из почек и поджелудочной железы млекопитающих или из микроорганизмов стереоспецифически гидролизуют амиды *L*-аминокислот. Образующуюся *L*-кислоту и непрореагировавший *D*-изомер затем разделяют методом дифференциальной растворимости. Амиды менее склонны к самопроизвольному гидролизу, чем эфиры, поэтому получают более чистые препараты аминокислот.

4. Стереоспецифический гидролиз *N*-ацил-*L*-аминокислот под действием аминоксилазы или карбоксипепсидазы, приводит к образованию *L*-аминокислот по схеме:



Принципы избирательного гидролиза аксиально или экваторально расположенной простой эфирной группы под действием ферментов лежит также в основе разделения рацемических смесей эфиров и терпенов.

Весьма перспективным представляется использование ферментов в качестве датчиков вредных и ядовитых веществ. Так, в качестве индикатора на фосфорорганические отравляющие вещества нервно-паралитического действия применяется холинэстераза.

Ее так же можно использовать и для определения фосфорорганических пестицидов. Степень ингибирования этого фермента в присутствии ОВ или пестицидов оценивают электрохимическими или спектрофотометрическими методами.

Подобно холинэстеразе карбоангидраза проявляет высокую чувствительность к хлорпроизводным алифатических углеводов, а гексокиназа – к аналогичным производным ароматических углеводов.

Все большее развитие получают технологические процессы с участием сложных ферментных систем, включающих коферменты. Так, созданы ферментные мембранные реакторы, катализирующие непрерывные процессы с регенерацией НАДН (восстановительное аминирование кетокислот, восстановление  $\alpha$  - кетокислот в  $\alpha$  - гидроксикислоты). Разработаны системы разделения рацематов посредством стереоспецифического активного транспорта. Например, мембрана, содержащая гексокиназу и фосфатазу, функционирует как насос, избирательно прокачивающий лишь *D*-глюкозу. Применение сопряженных ферментативных реакций с участием алкогольоксидазы и каталазы дрожжей *Hansenullapolimorpha* и формальдегид дисмутазы бактерии *Pseudomonasputida* позволило осуществить окисление метанола в муравьиную кислоту с выходом 88 – 94%. В промышленности большое будущее имеют ферменты, способные катализировать химические реакции в органической фазе («каталитические антитела»), в частности липазы. Существенно, что каталитическая активность панкреатической липазы свиньи сохраняется при концентрации воды в реакционной среде, составляющей всего 0,015 %, и при температуре 100 °С. Препараты липазы используют для синтеза оптически чистых сложных эфиров и феромонов, применяющихся в парфюмерии и медицине.

Для деградации и модификации антропогенных органических соединений, поступающих в окружающую среду, используют ферменты разных классов и в том числе лакказу, лигниназу, тирозиназу, монооксигеназу, диоксигеназу и др. Для очистки сточных вод предложена новая перспективная технология, основанная на использовании реакции пластеинообразования, открытой А.Я. Данилевским в 1886 г. Сущность работ А.Я. Данилевского состоит в экспериментальном доказательстве обращения протеолиза и воз-

возможности синтеза белковоподобных веществ (пластеинов) под действием протеолитических ферментов. Сточные воды содержат аминокислоты и пептиды, концентрация которых возрастает в результате гидролиза белковых компонентов отходов под воздействием пептидогидролаз микроорганизмов. Данная технология, активно внедряющаяся во Франции, нацелена на производство в промышленных масштабах кормовых белков из аминокислот и пептидов сточных вод.

Развитие клеточной и генной инженерии было бы невозможно, если бы в распоряжении исследователей не было целого набора специфических ферментов (рестриктаз, лигаз, синтетаз, ферментов избирательно разрушающих клеточную оболочку и др.). Так, в настоящее время в продаже имеется более 300 различных рестриктаз.

Ферменты широко используют в медицине, например в заместительной терапии в составе лечебных препаратов. Пероральное введение фенилаланин-аммиаклиазы снижает уровень фенилаланина в крови при фенилкетонурии. Протеолитические ферменты, амилазу и липазу применяют при заболеваниях желудочно-кишечного тракта и печени. В последние годы накопились данные об эффективности применения протеиназ в энзимотерапии злокачественных новообразований. Это объясняется большей проницаемостью мембран раковых клеток для гидролитических ферментов в сравнении с нормальными клетками, благодаря чему опухолевые клетки быстро лизируются при введении смеси протеиназ (препарат «папайотин»). Протеолитические ферменты – плазмин и активирующие его стрептокиназу и урокиназу используют для растворения тромбов в кровеносных сосудах и разжижении гноя; коллагеназу – для рассасывания рубцовых образований; эластазу – для задержки развития атеросклероза; лизоцим – для лечения конъюнктивитов; дезоксирибонуклеазу из стрептококка (стрептодорназа) – для лечения заболеваний верхних дыхательных путей и роговицы глаза.

L-аспарагиназу продуцируют *E. coli* и *Erwiniacarotovora*. Фермент используют при химиотерапии некоторых форм лейкемии. L-аспарагиназа отщепляет одну аминокислотную группу от аспарагина, превращая его в аспарагиновую кислоту. Избирательность действия фермента определяется потребностью некоторых форм опухолевых

клеток в аспарагине, тогда как нормальные клетки в аспарагине не нуждаются.

Нейраминидазу получают при культивировании *Vibrio cholera*. Фермент отщепляет остатки *N*-ацетилнейраминовой кислоты, входящей в мембрану некоторых опухолевых клеток, повышая таким образом их антигенную активность. Может быть использован при лечении некоторых форм лейкемии.

$\beta$ -лактамазы, инактивирующие пенициллины и цефалоспорины, используются при определении стерильности этих антибиотиков или при микробиологическом анализе клинического материала от больных, получающих эти антибиотики. В терапевтических целях их используют в случае тяжелой аллергической реакции на  $\beta$ -лактамные антибиотики. Фермент вводят внутримышечно или внутривенно совместно с другими препаратами (адреналин, антигистаминные средства).

### Задания

Изучите теоретические сведения и дополнительную литературу и ответьте письменно на ниже представленные вопросы.

### Вопросы

1. Что собой представляют протеолитические ферментные препараты? Где они применяются?
2. Что собой представляют пектолитические ферментные препараты? В каком растительном сырье они содержатся и применяются?
3. Что собой представляют целлюлолитические ферментные препараты?
4. Что собой представляют рацемические смеси аминокислот и эфиров терпенов?
5. Рассмотрите способы получения рацемических смесей аминокислот и эфиров терпенов.
6. Где применяются рацемические смеси аминокислот и эфиров терпенов?
7. Составьте сканворд или кроссворд по изученной теме (не менее 20-25 вопросов). Составленный кроссворд дайте одногрупп-

нику и после отгадывания кроссворда (сканворда) оцените его знания.

### **Работа №5. Получение безалкогольного напитка при выращивании комплекса микроорганизмов чайного гриба**

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

#### **Краткие теоретические сведения**

В природе широко распространен симбиоз микроорганизмов, это можно наблюдать в чайном грибе, в котором совместно развиваются дрожжи (дрожжевые грибки) и уксуснокислые бактерии. Таким образом, чайный гриб – это культура двух одновременно живущих микроорганизмов, образующих толстую слизистую пленку на поверхности подсахаренного чайного настоя. В результате их жизнедеятельности и образуется чайный квас, приобретающий слегка газированный кисловато-сладкий вкус. В банке готового чайного настоя можно видеть, что на поверхности прозрачно-буроватой жидкости «плавают» толстый диск: сверху белый, плотный и блестящий, снизу – сероватый и рыхлый. Научное название чайного гриба – медузомицет – обусловлено сходством с медузой. Тело чайного гриба представляет собой колонию дрожжей и уксуснокислых бактерий. Дрожжи, занимающие нижнюю часть слоевища гриба, перерабатывают содержащиеся в растворе сахар на спирт и углекислый газ (диоксид углерода), тем самым подготавливая питательную среду для уксуснокислых бактерий, которые склеены между собой особым веществом и образуют верхнюю, плотную часть гриба. Состав уксуснокислых бактерий неодинаков, а поэтому и вырабатываемые ими вещества неоднородны. Одни из них окисляют образованный дрожжами этиловый спирт в уксусную кислоту, другие превращают сахарозу в глюкозу и фруктозу и окисляют моносахара до глюконовых кислот. Образовавшиеся кислоты используются дрожжами для синтеза витаминов, необходимых для развития уксуснокислых бактерий. Предполагают, что колонии

дрожжевых грибков и уксуснокислых бактерий произошли от микроорганизмов, населяющих почвы Приморского края, которые с мельчайшими частицами земли, прилипшими к корням женьшеня или копытня, попадали в настой и, очутившись в благоприятных условиях, бурно размножались, образуя колонию в виде пленки на поверхности жидкости. Вероятно, так и возникла культура чайного гриба, которая затем распространилась чуть ли не по всему земному шару. Во многих аптеках Европы настой чайного гриба продается и пользуется большой популярностью. Концентрированный чайный гриб, запатентованный в Германии под названием «Комбука», сохраняет все необходимые активные вещества чайного гриба, за исключением уксусной кислоты и спирта. Установлено, что в состав напитка чайного гриба входят вещества, жизненно необходимые для организма человека: витамины С, группы В, Р и D; органические кислоты (уксусная, глюкуроновая, щавелевая, молочная, лимонная); ферменты (каталаза, амилаза, протеаза, липаза). Кроме того, в нем присутствуют антибиотики, подавляющие развитие стафилококков, стрептококков и других бактерий. Наиболее благотворное влияние на организм оказывает глюкуроновая кислота, обладающая дезинтоксикационным действием. Молочная кислота уничтожает вредную микрофлору кишечника и нормализует его функции. Чайный гриб эффективен при атеросклерозе, хорошо снимает повышенное артериальное давление, способствует уменьшению и даже прекращению головной боли, нормализует сон. Таким образом, постоянное употребление настоя чайного гриба улучшает самочувствие и даже излечивает от некоторых болезней. Для получения наиболее качественного напитка следует брать только кипяченую воду, так как вода из-под крана содержит много кальция, который в кипяченой воде выпадает в осадок. Кальций в некипяченой воде соединяется с глюкуроновой кислотой, образуя на дне сосуда осадок глюконата кальция. Порядок выполнения работы Лабораторная работа проводится на двух занятиях. На первом занятии готовят среду для развития чайного гриба и его посев. На втором проводят анализ готового напитка.

Занятие 1. Для того чтобы получить качественный «чайный гриб», необходимо тщательно соблюдать чистоту на стадии его

приготовления. Для создания оптимальных условий рекомендуется концентрация сахара в напитке 10 %, температура окружающей среды 25...30 °С, продолжительность настаивания – одна-две недели. Обязательный компонент жидкости, в которой развивается гриб, – настой чая, который служит источником азотистых веществ для дрожжей и уксуснокислых бактерий и сахарозы – источник углерода.

Вскипятить 1 л воды, добавить в воду одну чайную ложку (или один пакетик) чая.

Через 15...20 мин, когда раствор настоится, добавить в него 100 г сахарозы (сахарного песка), тщательно перемешать, остудить до температуры 25...30 °С.

Подготовленный раствор отфильтровать через капроновое или металлическое ситечко непосредственно в подготовленную банку (объемом 2–3 литра).

Внести в подготовленный чайный раствор слой чайного гриба, отделенного от уже растущего и используемого в качестве маточной культуры чайного гриба. Культивирование проводить при комнатной температуре (20...25 °С), накрыв банку с грибом салфеткой. Полученный напиток может быть использован для определения в нем некоторых продуктов метаболизма. В банку по мере необходимости заливают раствор чая и сахарный песок для получения новой порции чайного напитка. Разросшийся чайный гриб в дальнейшем можно разрезать на мелкие кусочки, как по горизонтали, так и по вертикали и засеять новые емкости с подготовленным чайно-сахарным раствором.

Занятие 2. Для оценки качества напитка определяют количество накопившихся кислот.

Определить уровень рН (см. лабораторную работу 1). Обычно рН настоя имеет кислую реакцию в зоне рН от 5 до 3.

Определить массовую долю молочной кислоты титрометрическим методом. Метод основан на нейтрализации молочной кислоты гидроокисью натрия (омыление ангидридов лактиломочных кислот щелочью) при нагревании и нейтрализации избытка щелочи серной кислотой. В коническую колбу со шлифом объемом 250 мл внести 10 мл настойки чайного гриба, 80 мл дистиллированной воды и 20 мл раствора 1 н NaOH, перемешать и кипятить с обратным

холодильником в течение 5 мин. Затем охладить, предварительно закрыв колбу пробкой с трубкой, наполненной натронной известью, добавить 3 капли раствора фенолфталеина и титровать раствором 1 н  $\text{H}_2\text{SO}_4$  до обесцвечивания. Параллельно провести контрольный опыт. В коническую колбу со шлифом объемом 250 мл внести 20 мл 1 н  $\text{NaOH}$ , 90 мл дистиллированной воды; кипятить с обратным холодильником в течение 5 мин; охладить, закрыв ее пробкой с трубкой, наполненной натронной известью; добавить 3 капли раствора фенолфталеина и титровать 1 н  $\text{H}_2\text{SO}_4$  до обесцвечивания.

3. Массовую долю молочной кислоты  $X$ , % вычислить по формуле

$$X = \frac{(V_{on} - V_K) \cdot K \cdot 0,09}{100}, \quad (1)$$

где  $V_{on}$  – объем 1 н  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , израсходованной на титрование избытка 1 н  $\text{NaOH}$  опытной пробы, мл;

$V_K$  – объем 1 н  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , израсходованной на титрование избытка 1 н  $\text{NaOH}$  контрольной пробы, мл;

$K$  – поправочный коэффициент для раствора 1 н  $\text{NaOH}$ ;

0,09 – масса молочной кислоты, соответствующая 1 см<sup>3</sup> 1 н  $\text{NaOH}$ , г/см<sup>3</sup> ;

$V$  – объем раствора чайного гриба, взятого на анализ, мл; 100 – коэффициент пересчета на 100 мл раствора чайного гриба.

4. Определить массовую концентрацию уксусной кислоты (титруемую кислотность) по количеству гидроокиси натрия, израсходованной на титрование уксусной кислоты, содержащейся в растворе чайного гриба. В стакан пипеткой внести 5 мл раствора чайного гриба, добавить 10 мл дистиллированной воды и две-три капли раствора фенолфталеина и титровать раствором 0,1 н  $\text{NaOH}$  до появления исчезающего в течение 30 с розового окрашивания.

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

$$P = \frac{0,06 \cdot 100V_1}{V_2} \quad (2)$$

где 0,06 – количество уксусной кислоты в г, соответствующее 1 мл раствора 0,1 н NaOH;

$V_1$  – количество раствора 0,1 н NaOH, пошедшего на титрование;

$V_2$  – количество раствора чайного гриба, взятого на титрование, мл.

За окончательный результат принять среднеарифметическое  $P$  двух параллельных определений  $P_1$  и  $P_2$ .

В виде таблицы 4 записать, как в процессе культивирования менялись физико-химические и органолептические показатели настоя чайного гриба.

Таблица 4 - Результаты анализа физико-химических и органолептических показателей настоя чайного гриба

Время культивирования, сут.	Показатели			Органолептическая оценка
	Уровень рН	Кол-во молочной кислоты, %	Кол-во уксусной кислоты, %	
5				
7				
10				
14				

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

### **Работа №6. Влияние комплексных улучшителей на качество хлеба**

**Цель работы:** изучение теоретических основ влияния комплексных хлебопекарных улучшителей на свойства теста и качество хлеба, практическим путем выявить эти зависимости.

### *Методические аспекты проведения работы*

Основной задачей работы является выпекание хлеба с различным количеством хлебопекарных улучшителей окислительного действия, сахара, жировых продуктов и определение их влияния на качество теста и хлеба. Для проведения данной работы используется методики проведения лабораторных выпечек, разработанных на кафедре технологии хлебопекарного производства МГУПП.

Применение отдельных улучшителей при производстве хлебобулочных изделий интенсифицирует процессы, протекающие при приготовлении теста и улучшает качество готовых изделий в большей степени, нежели их раздельное применение. Такое применение улучшителей позволяет также снижать их расход. Поэтому при производстве хлебобулочных и кондитерских изделий у нас в стране и за рубежом широко применяются добавки, получившие название комплексные хлебопекарные улучшители (КХУ). В рецептуру современных КХУ входят: улучшители окислительного действия (аскорбиновая кислота, ферментный препарат глюкозооксидаза, ферментативно-активная соевая мука, обладающая активной липоксигеназой и др.); ферментные препараты, содержащие амилазы, пентозаназы, протеазы и другое ферментативно-активное сырье – солод и др.; минеральные соли; эмульгаторы; модифицированные крахмалы (окисленные, набухающие, экстразионные); органические кислоты (лимонная, молочная и др.); ингибиторы развития плесеней и возбудителей картофельной болезни хлеба; наполнители (пшеничная мука, соевая мука, клейковина, крахмал и др.). Комплексные хлебопекарные улучшители применяются для ускорения технологического процесса при производстве хлебобулочных изделий из муки со средними и пониженными хлебопекарными свойствами (слабой и крепкой клейковиной, пониженной газообразующей способностью и т.д.), сдобных, мелкоштучных изделий, замороженных полуфабрикатов, изделий из слоёного теста с пониженным содержанием сахара и жира в их рецептуре и для корректировки качества муки на мельницах. Для хлеба из ржаной и смеси её с пшеничной мукой производятся пищевые добавки, которые используются в качестве подкислителей при ускоренных технологиях. Производятся КХУ в порошкообразном виде - растворимые и не растворимые в воде. От-

дельные фирмы предлагают использовать вырабатываемые ими жидкие КХУ. Расход порошкообразных комплексных улучшителей не растворимых в воде (для пшеничных хлебобулочных изделий) колеблется от 0,1 % до 1,5 % (в отдельных случаях 5,0 %) от массы муки, растворимых в воде - от 0,01 % до 0,1 %; подкислителей - улучшителей для изделий, вырабатываемых с использованием ржаной муки, - от 0,5 % до 2,5 %. Композитные добавки, вводимые в состав улучшителей, разработчики выбирают исходя из назначения улучшителя. По заданию Российского Союза пекарей для хлебопекарной промышленности в нашей стране предложены высокоэффективные хлебопекарные улучшители серии «Амилокс», «Шанс», «Топаз», «Отон», а также улучшители серии «БиоРос» («Классик», «Колорит», «Мастер», «Рекорд», «Поток», «Колос», «Гарант») и др. В настоящее время хлебопекарные улучшители для отечественной промышленности предлагают и производят также компании из Германии, Великобритании, Франции, Австрии, Турции и других стран. [12,13]

*Оборудование, приборы и реактивы.*

Сырье (мука, вода, соль, дрожжи, сахар, жир, КХУ БиоРос «Колорит», «Классик» и «Рекорд»), сосуд для брожения те-ста, хлебопекарные формы (размерами: по основанию 10×16 см, по верхнему краю 12×17, по высоте 10 см), железный лист диаметром не менее 20 см для расстойки и выпечки хлеба, расстоечный шкаф и пароконвекционная печь марки UNOX. Определение влияния комплексных улучшителей качества хлеба. Выпекают хлеб из пшеничной муки высшего или первого сорта безопарным способом с добавлением КХУ.

Серия опытов №1:

- вариант 1 (контрольный) - без добавок;
- вариант 2 - с добавлением КХУ БиоРос «Классик»;
- вариант 3 - с добавлением КХУ БиоРос «Рекорд».

Серия опытов №2:

- вариант 1 (контрольный) - с добавлением 3 % сахара и 5 % жира;
- вариант 2 - с добавлением 3 % сахара, 5 % жира и КХУ БиоРос «Колорит»;

- вариант 3 -с добавлением 3 % сахара, 5 % жира и КХУ Био-Рос «Ре-корд».

КХУ можно применять и других производителей. Добавляются они в оптимальных дозировках с учетом хлебопекарных свойств (используемой) муки. При приготовлении теста следят за ходом технологического процесса, его свойствами, ходом расстойки, а по окончании выпечки и после остывания определяют и сравнивают качество полученных проб хлеба.

## **Работа №7. Применение ферментных препаратов в кондитерском производстве**

**Цель работы:** ознакомление с методами определения глюкозы, фруктозы, галактозы, лактозы, сахарозы

### *Методические аспекты проведения работы*

*Реактивы:* буфер триэтаноламина рН = 7,6; раствор NADP<sup>+</sup>; раствор АТР; раствор гексокиназы /глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (HK/G-6-P-DH); раствор фосфоглюкозоизомеразы P-G-I.

Проведение анализа. Определение проводят в кюветах с толщиной слоя 1 см при 20-25 °С. После внесения растворов отдельных реагентов смесь тщательно перемешивают пластмассовым шпателем. В пробе должно содержаться 0,03-0,1 г/дм<sup>3</sup> глюкозы и фруктозы. Величину экстинкции измеряют при длинах волн 334, 340 или 365 нм (таблица 5).

Таблица 5 - Проведение анализа

Растворы, вносимые в кювету	Холостой опыт	Проба
Буфер триэтаноламина, рН=7,6, см <sup>3</sup>	1,00	1,00
NADP <sup>+</sup> , см <sup>3</sup>	0,10	0,10
АТР, см <sup>3</sup>	0,10	0,10
Объем пробы, см <sup>3</sup>	-	0,10
Вода, см <sup>3</sup>	2,00	1,90
Перемешать, через 3-4 мин. определить экстинкцию E <sub>1</sub> , затем добавить НК/G-6-P-DH, см <sup>3</sup>	0,02	0,02

## Продолжение таблицы 5

Растворы, вносимые в кювету	Холостой опыт	Проба
Перемешать, через 15 мин. определить экстинкцию $E_2$ . Если экстинкция продолжает увеличиваться, следует продолжить ее определение до тех пор, пока прирост экстинкции в течение 5 мин. станет постоянным. Затем добавить P-G-I, см <sup>3</sup>	0,02	0,02
Перемешать, через 15 мин. определить экстинкцию $E_3$ .		

## Расчет

$$\Delta E_{\text{глюкозы}} = E_2 - E_1; \Delta E_{\text{фруктозы}} = E_3 - E_2, \quad (3)$$

## Расчет концентрации сахаров в пробе

$$c_{\text{пр}} = \frac{V_R M}{d V_{\text{пр}} \varepsilon \cdot 1000} \Delta E \quad (4)$$

где  $V_R$ -объем реакционной среды, для глюкозы  $V_R = 3,22 \text{ см}^3$ , для фруктозы  $V_R = 3,24 \text{ см}^3$ ;

$M$  - молекулярная масса глюкозы и фруктозы,  $M = 180,16 \text{ г/моль}$ ;

$d$  - толщина слоя раствора в кювете, см;

$V_{\text{пр}}$  - объем пробы, внесенный в кювету, см<sup>3</sup>;

$\varepsilon$  - коэффициент экстинкции для NADPH ( $\text{дм}^3 \text{ ммоль}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ) при длинах волн: 334 нм - 6,18; 340 нм - 6,30; 365 нм - 3,50.

Подставив значения, получим формулы для расчета концентрации глюкозы (грамм глюкозы или фруктозы, деленный на  $\text{дм}^3$  пробы)

$$c_{\text{глюкозы}} = \frac{3,22 \cdot 180,16}{1 \cdot 0,1 \cdot \varepsilon \cdot 1000} \Delta E_{\text{глюкозы}} = 5,801 \frac{\Delta E_{\text{глюкозы}}}{\varepsilon} \quad (5)$$

$$c_{\text{фруктозы}} = \frac{3,24 \cdot 180,16}{1 \cdot 0,1 \cdot \varepsilon \cdot 1000} \Delta E_{\text{фруктозы}} = 5,837 \frac{\Delta E_{\text{фруктозы}}}{\varepsilon} \quad (6)$$

Подставив значения, получим формулы для расчета концентрации глюкозы (грамм глюкозы или фруктозы, деленный на  $\text{дм}^3$  пробы). После определения глюкозы и фруктозы результаты следует умножить на фактор разведения, имевший место при приготовлении пробы.

Пример. Определить концентрацию глюкозы и фруктозы в инвертном сиропе. Навеску инвертного сиропа массой 0,18 г, плотностью  $1,4 \text{ г/см}^3$  растворили в дистиллированной воде, количественно перенесли в мерную колбу на  $100 \text{ см}^3$  и довели объем до метки. Полученный раствор был взят для опыта в количестве  $1,1 \text{ см}^3$ , остальные реагенты взяты в соответствии с данными таблицы. Измерение поглощения проводили при длине волны 365 нм:  $E_1=0,020$ ;  $E_2=0,124$ ;  $E_3=0,220$ . Таким образом

$$\Delta E_{\text{глюкозы+фруктозы}} = E_3 - E_1 = 0,220 - 0,020 = 0,200 \quad (6)$$

$$\Delta E_{\text{глюкозы}} = E_2 - E_1 = 0,124 - 0,020 = 0,104$$

$$\Delta E_{\text{фруктозы}} = E_3 - E_2 = 0,220 - 0,124 = 0,096$$

Концентрация в пробе

$$c_{\text{пр}} = \frac{V_R M}{l V \epsilon \cdot 1000} \Delta E \quad (7)$$

где  $V_R$ -объем реакционной среды: для глюкозы  $3,22 \text{ см}^3$ , для фруктозы  $3,24 \text{ см}^3$ ;

$M$  - молекулярная масса глюкозы и фруктозы  $180,16 \text{ г/моль}$ ;

$l$  - толщина слоя раствора в кювете =  $1 \text{ см}$ ;

$V$  - объем пробы, внесенный в кювету,  $V=0,1 \text{ см}^3$ ;

$\epsilon$  - коэффициент экстинкции для NADPH при 365 нм  $-3,50 \text{ дм}^3 \cdot \text{ммоль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ .

Подставив значения, получим концентрацию,  $\text{г/дм}^3$  в инвертном сиропе:

- ГЛЮКОЗЫ:

$$C_{\text{глюкозы}} = \frac{3,22 \cdot 180,16}{1 \cdot 0,1 \cdot \varepsilon \cdot 1000} \Delta E_{\text{глюкозы}} = 5,801 \frac{0,104}{3,50} = 0,172$$

- ФРУКТОЗЫ:

$$C_{\text{фруктозы}} = \frac{3,24 \cdot 180,16}{1 \cdot 0,1 \cdot \varepsilon \cdot 1000} \Delta E_{\text{фруктозы}} = 5,837 \frac{0,096}{3,50} = 0,160$$

После определения глюкозы и фруктозы результаты следует умножить на фактор разведения, имевший место при приготовлении пробы. Фактор разведения F равен отношению объема приготовленного раствора к объему навески инвертного сиропа. Объем 0,18 г инвертного сиропа плотностью 1,40 г/см<sup>3</sup> составляет: 0,18/1,40 = 0,129 см<sup>3</sup>, тогда F=250/0,129= 1938.

Следовательно, в анализируемом сиропе концентрация, г/дм<sup>3</sup> глюкозы: 0,172·1938 = 333,3; фруктозы: 0,160·1938 = 310,1. Так как 1 дм<sup>3</sup> инвертного сиропа имеет массу 1400 г, то массовые доли, % определяемых углеводов составляют: для глюкозы: 333,3·100/1400 = 23,7; для фруктозы: 310,1·100/1400 = 22,2.

*Определение глюкозы, фруктозы и сахарозы*

Реактивы: буфер триэаноламина, рН = 7,6; нитратный буфер, рН 4,6; раствор NADP<sup>+</sup>; раствор АТФ; раствор гексокиназы/глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (HK/G-6-P-DH); раствор β-фруктозидазы.

Проведение анализа. В первой пробе определяется содержание глюкозы и фруктозы согласно описанию в предыдущем методе, во второй пробе определяется отдельно содержание глюкозы до гидролиза и после гидролиза сахарозы (таблица 6). Если экстинкция продолжает увеличиваться, следует продолжить ее определение до тех пор, пока прирост экстинкции в течение 5 мин станет постоянным. При постоянном экстинкционном приросте определяют экстинкцию E глюкозы до и после гидролиза на время последней добавки фермента.

Таблица 6 - Содержание глюкозы до гидролиза и после гидролиза сахарозы

Растворы, вносимы в кювету	Холостой опыт	Содержание глюкозы	
		до гидролиза	после гидролиза
Цитратный буфер, pH=4,6, см <sup>3</sup>	0,20	-	0,20
Раствор β-фруктозидазы, см <sup>3</sup>	0,02	-	0,02
Объем пробы, см <sup>3</sup>	-	0,10	0,10
Перемешать, через 15 мин. добавить буфер триэтанол-амин, pH=7,6, см <sup>3</sup>	1,00	1,82	1,60
Вода, см <sup>3</sup>	1,70	0,10	0,10
NADP+, см <sup>3</sup>	0,10	0,10	0,10
АТР, см <sup>3</sup>	0,10		
Перемешать, через 3 мин. определить экстинкцию E <sub>1</sub> , затем добавить НК/G-6-P-DH, см <sup>3</sup>	0,02	0,02	0,02
Перемешать, через 15 мин. определить экстинкцию E <sub>2</sub> .			

## Расчет

$$\Delta E_{\text{глюкозы}} = E_{2 \text{ глюкозы до гидролиза}} - E_1 \quad (8)$$

$$\Delta E_{\text{мальтозы}} = E_{2 \text{ глюкозы после гидролиза}} - E_{2 \text{ глюкозы до гидролиза}} \quad (9)$$

$$C_{\text{глюкозы}} = \frac{3,02 \cdot 180,16}{1 \cdot 0,1 \cdot \varepsilon \cdot 1000} \Delta E_{\text{глюкозы}} = 5,441 \frac{\Delta E_{\text{глюкозы}}}{\varepsilon}, \frac{\text{г}}{\text{дм}^3}$$

$$C_{\text{мальтозы}} = \frac{3,02 \cdot 342,3}{1 \cdot 0,1 \cdot \varepsilon \cdot 1000} \Delta E_{\text{мальтозы}} = 10,337 \frac{\Delta E_{\text{мальтозы}}}{\varepsilon}, \frac{\text{г}}{\text{дм}^3}$$

где  $\varepsilon$  - коэффициент экстинкции для NADH,  $\text{дм}^3 \cdot \text{ммоль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  при длинах волн: 334 нм -6,18; 340 нм -6,30; 365 нм -3,50.

Молярная масса глюкозы равна 180,16 г/моль; молярная масса мальтозы - 342,3 г/моль; объемы растворов в обеих пробах 3,02 см<sup>3</sup>. Для расчета содержания глюкозы и мальтозы следует учесть фактор разведения при приготовлении пробы.

## **Работа №8. Биоконверсия вторичного сырья**

**Цель работы:** произвести анализ отходов виноградного вина (винной кислоты).

### ***Методические аспекты проведения работы***

Отходы виноградной и винодельческой промышленности богаты спиртом и винной кислотой. Особую ценность представляет винная, или виннокаменная кислота, которая широко используется в кондитерской, безалкогольной, консервной, винодельческой (для подкисления плоских вин) и ликероводочной промышленности, а также в фармацевтической, фотохимической, текстильной и полиграфической промышленности. Остатками виноградно-винодельческой промышленности являются: гребни, виноградные выжимки, дрожжевая гуща и осадки, а также листья и побеги виноградной лозы. По данным различных авторов, выход выжимок определяется при применении ручных прессов: с гребнями -от 15% до 25 % и без гребней -около15 %. На 100 кг свежих выжимок в среднем приходится: 13 кг гребней, 25 кг кожицы, 12 кг семян и 50 кг вина.

В зависимости от системы прессов и технологического процесса переработки винограда получают различные виды выжимок. Например, при шампанском способе виноделия виноград поступает в прессы вместе с гребнями, которые остаются в выжимках. Такие выжимки называются белыми, или сладкими, они не содержат спирта, а только сахар. При виноделии по красному способу выжимки почти не содержат сахара, а лишь спирт. По способу переработки винограда выжимки делят на три группы: сладкие, сброженные и спиртованные. Самая высокая концентрация сахара,

спирта и винной кислоты - в спиртованной выжимке. Содержание спирта в спиртованных выжимках колеблется от 5 % до 8%.

Красные выжимки содержат большое количество винной кислоты, в среднем 0,9%, а белые выжимки - 0,5%. Выход винных жидких дрожжей из сусла составляет (прессы непрерывного действия) при выделке сухих вин 6% и сладких 4,5% от выхода сусла. Отходы дрожжей и осадков при корзиночных прессах при выделке сухих вин составляет 3,4% и сладких - 2,5-3,5%. Из дрожжевых осадков при комплексном их использовании получают спирт и винную кислоту, аминокислоты в чистом виде, дрожжевые концентраты и автолизаты, ферментные препараты, кормовые продукты для животноводства. Кроме того, из дрожжей получается энантивый эфир, производство которого налажено во Всесоюзном институте виноделия и виноградарства «Магарач» проф. Моргенштерном. Весьма ценным отходом является винный камень, который выкристаллизовывается при выдержке вина на стенках деревянных бочек и бочек. Винный камень получается также при уваривании виноградного сока в вакуум аппаратах. Винный камень и виннокислая известь (ВКИ) являются единственным источником получения винной кислоты - соединения, незаменимого в химической и фармацевтической промышленности. Винная кислота также находит широкое применение в пищевой, полиграфической, электронной и электротехнической промышленности. Винный камень - кристаллический осадок, выпадающий и откладывающийся на дне и стенках винодельческих емкостей при брожении сусла, хранении и обработке вина и сока-полуфабриката. Особо надо отметить появившийся новый источник производства винной кислоты из листьев и зеленых побегов. Количество винной кислоты в зеленых частях виноградного куста колеблется от 1,9 % до 2,4 % в переводе на сухое вещество. Утилизация остатков виноделия сводится пока к получению спирта и виннокислой извести, а между тем в этих остатках имеется ряд других очень ценных веществ. Из выжимок можно получить франкфургскую чернь, ярь-медянку, горючие газы, деготь. В зеленых листьях содержится витамин С. Из семян винограда получается виноградное масло, которое употребляется в пищу, на приготовление мыла, олифы и смазки моторов. Виноградные семена идут также для производства суррогата кофе. Семена

содержат до 9% танинов и могут быть использованы как высококачественный дубильный материал. При получении масла из семян измельченные остатки используются как удобрительные смеси. По извлечению спирта и винной кислоты остатки мезги могут служить кормом скоту. Из коньячной барды и дрожжевых осадков получают, кроме спирта, винно-кислых соединений и кормовых продуктов, также глицерин, фурфурол, ферментные препараты. При наиболее полном использовании виноградных выжимок путем прессования под высоким давлением получают декоративные плитки, строительные блоки и другие полезные изделия. Комплексное использование отходов виноделия и смежных с ним отраслей, перерабатывающих виноград, способствует уменьшению загрязнения окружающей среды.

#### *Определение винной кислоты в виноградном вине*

Винную кислоту в вине определяют методом, который заключается в переводе винной кислоты в кислую соль калия, последующем осаждении этой соли, растворении ее в горячей воде и титровании щелочью. Содержание винной кислоты в вине выражают в г/л с точностью до одного десятичного знака.

Материалы и реактивы: уксусная кислота, ледяная; 20%-ный раствор уксуснокислого калия; хлористый калий; спиртовой раствор хлористого калия.

К 15 г хлористого калия добавляют 20 мл 96%-ного этилового спирта и объем доводят до 100 мл. 0,1 н. раствор едкого натра. Этиловый спирт 96%-ный. 4.3.2.2 Методика определения 100 мл вина выпаривают в фарфоровой чашке на водяной бане до половины объема; остаток с ополосками переливают в коническую колбу, на которую предварительно нанесена метка 100 мл доводят объем дистиллированной водой до метки, добавляют 2 мл уксусной кислоты и 0,5 мл раствора уксуснокислого калия, после чего прибавляют при помешивании 15 г измельченного в порошок хлористого калия, затем приливают 20 мл этилового спирта и начинают осторожно тереть стеклянной палочкой о стенки колбы (это вызывает начало кристаллизации винного камня). Колбу прикрывают и оставляют на сутки при температуре 10-15 °С. Осадок отделяют отсасыванием, фильтруя через 2 слоя фильтровальной бумаги на воронке Бюхнера в колбу Бунзена.

Осадок на фильтре и коническую колбу промывают в несколько приемов 0 мл спиртового раствора хлористого калия, после чего тщательно смывают осадок с фильтра горячей водой в коническую колбу. Затем во избежание потерь осадка на фильтре следует промыть фильтр горячей водой, сливая фильтрат с ополосками в коническую колбу. Колбу с содержимым нагревают до кипения и титруют 0,1 н. раствором щелочи в присутствии фенолфталеина.

#### Расчет

Количество винной кислоты, г в 1 л вина (x) рассчитывают по формуле

$$x = 0,015(V+1,5)10 = 0,15(V+ 1,5) \quad (10)$$

где 0,015 – количество винной кислоты, соответствующее 1 мл 0,1 н. раствора щелочи (в данном случае винная кислота титруется как одноосновная), г;

V – количество щелочи, пошедшее на титрование, мл;

1,5 – поправка на образование кислой калийной соли винной кислоты, выраженная в мл 0,1 н. раствора NaOH;

10 – множитель для пересчета на 1 л вина.

#### *Пример*

Если для определения было взято 100 мл вина и на титрование осажденного винного камня пошло 23,5 мл 0,1 н. раствора NaOH, то в 1 л вина будет содержать-ся:  $15(23,5+1,5)=3,75$  г винной кислоты.

#### *Определение винной кислоты в виннокислотном сырье*

Материалы и реактивы: 20%-ный раствор соляной кислоты; раствор углекислого калия: 66 г безводной соли растворяют в 100 мл воды; уксусная кислота (ледяная); 96%-ный этиловый спирт; 0,1 н. раствор едкого натра или едкого калия.

#### *Проведение анализа*

К навеске исследуемого материала в количестве 6 г добавляют 18 мл раствора соляной кислоты и в течение 10 минут часто помешивают. Затем смесь переносят в мерную колбу емкостью 200 мл, доводят объем до метки и фильтруют через складчатый фильтр в сухую колбу.

100 мл фильтра, отмеренные пипеткой, переносят в стакан с емкостью 250-300 мл, нагревают до кипения и прибавляют по Аплям из бюретки в течение 5 мин 10 мл раствора углекислого Алия, при этом кипение не должно приостанавливаться. Спустя 20 минут кипячение прекращают, жидкость с осадком переносят в мерную колбу емкостью 200 мл, после охлаждения доводят до метки и вновь фильтруют через складчатый фильтр. 100 мл фильтрата переносят в коническую колбу емкостью 300 мл, на которую предварительно нанесена метка 15 мл. Раствор выпаривают до метки и, не прекращая нагревания, добавляют 3,5 мл уксусной кислоты при помешивании, которое продолжают еще 5 мин, после чего смесь оставляют в покое на 10 мин. Затем в колбу добавляют 100 мл спирта, раствор помешивают 10 мин и фильтруют через 2 слоя фильтровальной бумаги на воронке Бюхнера при отсасывании. Промыв осадок спиртом до исчезновения кислой реакции (что определяется с помощью лакмуса), его переносят, смывая горячей водой в ту же коническую колбу на 300 мл. Сюда же добавляют дистиллированной воды в таком количестве, чтобы общий объем составлял примерно 200 мл, нагревают до кипения и титруют 0,1 раствором щелочи в присутствии фенолфталеина.

Содержание винной кислоты (х) в г/100 г сырья рассчитывается по следующей формуле

$$X = (0,015B \cdot 100 \cdot 4) / D \quad (11)$$

где 0,015 - количество кислой калийной соли винной кислоты, соответствующее 1 мл 0,1 н. раствора щелочи, г;

В - количество 0,1 н. раствора щелочи, пошедшее на титрование, мл;

100-множитель для пересчета на 100 г сырья;

4-разбавление;

D-навеска сырья, г.

*Пример*

Пусть при навеске 6 г на титрование пошло 24,5 мл 0,1 н. раствора щелочи. Тогда содержание винной кислоты в 100 г сырья будет  $(0,015 \cdot 24,5 \cdot 100 \cdot 4) / 6 = 24,5$  г.

### Контрольные вопросы

1. Каковы цели, задачи и перспективы развития биоконверсии?
2. Дайте краткую характеристику растительного сырья.
3. Каково химическое строение и свойства целлюлозосодержащего и пентозансодержащего сырья?
4. Дайте характеристику крахмалосодержащего и сахаросодержащего сырья - химический состав и питательная ценность.
5. Теоретические основы биоконверсии растительного сырья. Какие способы конверсии вы знаете?
6. В каких отраслях промышленности используются отходы виноградного виноделия?
7. На чем основан принцип метода определения винной кислоты в виноградном сырье?

### Работа №9. Исследование растительного сырья

**Цель работы:** освоение методики определения содержания сахаров в растительном сырье.

#### *Методические аспекты проведения работы*

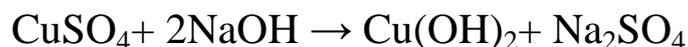
Все моносахариды, имеющие свободную альдегидную или кетонную группу, обладают восстанавливающей способностью. На этом основан наиболее общий, классический химический метод количественного определения сахаров, которые восстанавливают в щелочной среде сернистую медь в закись меди или до свободных металлов. Этим же методом можно определить и дисахариды, предварительно проведя их гидролиз до моносахаридов кислотой или ферментом. Метод применим для зерна различных культур и продуктов его переработки, вин, виноматериалов и коньяков.

Материалы, реактивы-размолотое зерно различных культур, - раствор Фелинга I – 4%-ный раствор сернистой меди; раствор Фелинга II - щелочной раствор сегнетовой соли (виннокислый калий/натрий); реактив Барнштейна – 6% раствор сернистой меди и 1,25 % -ный раствор едкого натра; раствор железосаммиачных

квасцов или раствор сернокислого железа (окисного); 0,1н раствор марганцовокислого калия; дистиллированная вода.

*Проведение анализа*

На технических весах берут навеску размолотого зерна  $10\text{г} \pm 0,01\text{г}$ , пересыпают в фарфоровую ступку и добавляют реактив Барнштейна (15мл 6%  $\text{CuSO}_4$  и 15мл 1,25%  $\text{NaOH}$ ), тщательно смешивают фарфоровым пестиком, при этом происходит следующая химическая реакция:



Данный процесс способствует тому, что происходит инактивация ферментов и осаждение белков зерна, которые могут повлиять на результаты определения. В ступку добавляют 70мл дистиллированной воды, обмывая при этом пестик. Для лучшего растворения сахаров и полного осаждения белков ступку ставят в термостат на 30 минут при температуре  $45-50^\circ\text{C}$ . Затем содержимое ступки фильтруют через складчатый фильтр в сухую колбу с широким горлышком. После окончания фильтрования берут пипеткой 20 мл прозрачного фильтрата, переносят в маленькую коническую термостойкую колбочку и добавляют в нее взятые пипеткой растворы Фелинга I и Фелинга II, по 20 мл каждый. При этом происходит следующее: нерастворимое основание  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  взаимодействует с раствором Фелинга II ( $\text{COOK}(\text{CHOH})_2\text{COONa}$ ), связывая медь и удерживая ее в растворе в виде комплексного соединения: Раствор в конической колбе нагревают на плитке до кипения и кипятят ровно три минуты (время фиксируют по песочным часам). Кипение должно протекать спокойно, жидкость в колбе должна оставаться синего цвета, что указывает на избыток реактива Фелинга, а, следовательно, на полное окисление сахаров. При этом растворенные сахара вступают во взаимодействие с комплексными соединениями меди с образованием осадка закиси меди  $\text{Cu}_2\text{O}$ , сахар окисляется до соответствующей кислоты и вновь образуется сегнетова соль. После трехминутного кипения колбочку снимают с плитки и ставят на охлаждение, при этом оседает хорошо заметный красный осадок закиси меди. Жидкость над осадком должна сохранять ярко синий цвет. Синюю жидкость фильтруют

через асбестовый фильтр в колбу Бунзена, соединенную с отсасывающим насосом. Осадок закиси меди должен остаться в колбе, но час часть его может перейти и на фильтр. Осадок в колбе и на фильтре промывают горячей водой 3-4 раза, отсасывая жидкость в ту же колбу Бунзена. Небольшой слой горячей воды должен постоянно покрывать осадок в колбе и на фильтре, чтобы он не окислялся кислородом воздуха.

После окончания промывания под фильтр подставляют чистую колбу Бунзена, а промытый осадок в колбочке растворяют 10-15 мл железоаммиачных квасцов. Полученный раствор постепенно переливают на асбестовый фильтр так, чтобы находящийся на нем часть осадка  $\text{Cu}_2\text{O}$  также растворилась. Колбочку, где был осадок, ополаскивают горячей водой 2 раза и все сливают на фильтр. Обычно жидкость фильтруют без отсасывания воздуха из колбы Бунзена. Процесс растворения осадка идет в соответствии со следующей реакцией: При этом закись меди окисляется до  $\text{CuSO}_4$  окисленным железом; а железо восстанавливается до закисного -  $\text{FeSO}_4$ , причем количество образовавшегося сернокислого железа закисного эквивалентного количеству окислившейся меди.

Зеленоватый раствор в колбе Бунзена переносят в сухую коническую колбу и титруют 0,1N раствором перманганата калия до появления розового окрашивания (от последней капли), которое не исчезает в течение 1 мин. При этом происходит следующее:



Сернокислое железо закисное количественно окисляется перманганатом калия до сернокислого железа окисного, а перманганат калия при этом восстанавливается до сернокислого марганца сернокислого калия.

#### *Результаты и выводы*

По количеству израсходованного перманганата калия, зная его титр по меди, определяют по таблице количество сахара во взятой навеске. Титр перманганата по меди принимается 6,36.

Пример расчета, на титрование израсходовано 3,4мл  $\text{KMnO}_4$ , что соответствует  $6,36 \times 3,4 = 21,6$  мг меди.

В таблице 3, в графе «медь» нет величины 21,6, а есть 20,4 и 22,4мг меди. Величине 22,4мг меди соответствует 11мг сахара, следовательно,  $22,4 - 20,4 = 2$ мг меди соответствует 1мг сахара. Так как рассчитанная нами величина 21,6мг меди находится между имеющимися в таблице 3, то вычисляем разницу:  $22,4 - 21,6 = 0,8$ мг%.

Составляем пропорцию:

2мг меди соответствует 1 мг сахара

0,8мг меди соответствует X мг сахара

$X = 0,8 \times 1/2 = 0,4$ мг сахара.

Если 22,4мг меди соответствует 11 мг сахара, то 21,6мг меди соответствует  $11 - 0,4 = 10,6$ мг сахара. Далее необходимо определить процентное содержание сахара во взятой навеске размолотого зерна (рассчитать самостоятельно).

Таблица 7 - Определение сахара (глюкозы) по меди

Сахар, мг	Медь, мг						
10	20,4	33	64,6	56	105,8	79	144,5
11	22,4	34	65,5	57	107,6	80	146,1
12	24,3	35	68,3	58	109,3	81	147,7
13	26,3	36	70,1	59	111,1	82	149,3
14	28,9	37	72,0	60	112,8	83	150,9
15	30,2	38	73,8	61	114,5	84	152,5
16	32,2	39	75,7	62	116,1	85	154,0
17	34,2	40	77,5	63	117,9	86	155,6
18	36,2	41	79,3	64	119,6	87	157,2
19	38,1	42	81,1	65	121,3	88	158,8
20	40,1	43	82,9	66	123,0	89	160,4
21	42,0	44	84,7	67	124,7	90	162,0
22	43,9	45	86,4	68	126,4	91	163,6
23	45,8	46	88,2	69	128,1	92	165,2
24	47,7	47	90,0	70	129,8	93	166,7
25	49,6	48	91,8	71	131,4	94	168,3
26	51,5	49	93,6	72	133,1	95	169,9
27	53,4	50	95,4	73	134,7	96	171,5
28	55,3	51	97,1	74	136,3	97	173,1
29	57,2	52	98,9	75	137,9	98	174,6
30	59,1	53	100,6	76	139,6	99	176,2
31	60,9	54	102,3	77	141,1	100	177,8
32	62,8	55	104,1	78	142,8	101	-

Таблица 8 - Определение сахара (глюкозы) по меди (микрометод В.С. Ильина)

Сахар, мг	Медь, мг						
1	2,7	8	20,5	15	36,6	22	51,7
2	5,3	9	22,9	16	39,1	23	53,7
3	7,9	10	25,3	17	41,2	24	55,7
4	10,5	11	27,6	18	43,3	25	57,7
5	13,0	12	30,0	19	45,5	-	-
6	15,2	13	32,3	20	47,6	-	-
7	18,0	14	34,6	21	49,7	-	-

За результат анализа принимают среднеарифметическое результатов двух параллельных определений и округляют его до первого десятичного знака при массовой концентрации сахара до 50 г/л и до целого числа при массовой концентрации сахара 50г/л и более.

## Работа №10. Производство этилового спирта

**Цель работы:** изучение основных стадий производства спирта.

### *Методические аспекты проведения работы*

Спирт производят из сахара, а также из продуктов, которые содержат не менее 5% крахмала или сахара. Крахмал, который содержится в растительном сырье, непосредственно не перерабатывается дрожжами на спирт. Поэтому сырье сначала обрабатывают ферментами солода или ферментными препаратами и, таким образом, получают сусло, которое затем сброживают. Сброженную массу перегоняют и определяют содержание спирта. В зерне пшеницы, овсе и кукурузе содержится 58-75% крахмала, в зерне ячменя -40, риса - до 89, в картошке до 20%. Содержание сахаров корнеплодах сахарных Буряков -14-22%, у большинства плодов и ягод -4-18%.

Для переработки на спирт можно использовать некондиционное растительное сырье.

*Оборудование и материалы:* термометр жидкостный стеклянный с ценой деления 1°, секундомер, баня водяная, плитка; солод, дрожжи; колбы мерные объемом 50, 100, 200, 250 см<sup>3</sup>; колбы конические объемом 200 или 250 см<sup>3</sup>; стаканы лабораторные.

### Проведение анализа

Все виды зерна и бобовых предварительно очищают от пыли, земли, камней, металлических и других примесей с помощью просеивания, сит и магнитов. Далее сырье необходимо измельчить так, чтобы просеивание через сито с размером отверстий 1 мм составляло 85-95%, а для кукурузы - не менее 90-95%. Картофель, моют и измельчают на молотковой дробилке или терке. Размер частиц должен быть не более 3 мм.

Таблица 9 - Нормы расхода воды на каждый кг сухого сырья в зависимости от % содержания в нем крахмала

Крахмал, %	Вода, л	Крахмал, %	Вода, л	Крахмал, %	Вода, л	Крахмал, %	Вода, л
15	0,76	35	1,77	55	2,78	75	3,80
20	1,01	40	2,02	60	3,04	80	4,05
25	1,26	45	2,28	65	3,29	85	4,30
30	1,52	50	2,53	70	3,54	90	5,06

Подготовленное сырье взвешивают с целью расчета рецептуры и корректировки в дальнейшем технологического процесса приготовления бражки и учета выхода спирта. Для приготовления крахмалосодержащего сусла берем навеску измельченного зерна (пшеницы) весом 500 г и приливаем 1,5 л воды, температура воды составляет 50-55°C. Тщательно перемешиваем сусло и ставим на плитку для разваривания и дальнейшего осахаривания. Количество воды берут с таким расчетом, чтобы после осахаривания готовое сусло имело 16-18% сахара по сахарометру (соотношение 1:4 зерно: вода). Теоретически 1 кг крахмала под амилолитических ферментов превращается в 1,11 кг сахара. Таким образом, для получения раствора сахара концентрацией 18% (плотность 1,072 кг/л) необходимо 5,06 л воды на каждый кг крахмала, находящегося в сырье (таблицы 5 и 6). В указанное количество воды входит и вода, вносимая в сусло с солодовым молоком (или раствором фермента)

и влагой сырья (последнее относится картофелю и подмоченному зерну). Устанавливаем такой режим, что бы смесь кипела. Время разваривания составляет от 1,5 до 2 часов. Чем хуже сырье (подмоченное, подпорченное зерно), и чем крупнее помол, тем больше время разваривания.

Таблица 10 - Средний химический состав зерна, бобовых и картофеля (в % по массе)

Культура	Крахмал	Сахар	Белки	Культура	Крахмал	Сахар	Белки
Бобы	50-58	-	10-32	Пшеница	48-66	2-3	10-14
Горох	20-48	4-5	19-34	Рис	73-76	1-2	7-14
Гречиха	68-72	-	7-9	Рожь	46-55	4-7	7-12
Картофель	10-25	-	1,5-2,2	Сорго	70-73	-	10-13
Кукуруза	58-69	4-8	8-9	Чечевица	47-57	-	23-32
Овес	34-45	2-3	10-13	Ячмень	43-55	2-3	6-9
Просо	42-65	-	11-14				

Разваренную массу охлаждают до температуры осахаривания 57-58°C. Вносят солодовое молоко в разваренное и охлажденное сусло и выдерживают при этой температуре до полного расщепления крахмала до моносахаридов. Поддержание температуры особенно важно для этого процесса, так как понижение температуры увеличивает время процесса и способствует развитию бактерий, а увеличение температуры выше 70°C разрушает ферменты, в результате чего процесс осахаривания крахмала прекращается. Время осахаривания крахмала разного сырья различно и изменяется от 30 минут для картофеля и 1,5 часа для зерновых (кукуруза, пшеница), до 2 часов (ячмень). Указать более точное время осахаривания трудно, так как оно полностью зависит от степени измельчения сырья, температуры и длительности разваривание, активности и количества внесенных ферментов. Полноту осахаривания проверяют йодной пробой. При полном осахаривании окраска капли фильтрата сусла от прибавления к нему капли йода не должна, изменяться, что свидетельствует о полном распаде крахмала на простые сахара. Красный цвет свидетельствует о наличии в сусле большого количества декстринов, сине-фиолетовый цвет указывает на присутствие частично неосахаренного крахмала. Цветовое окрашивание сусла характерно только при использовании солода, при осахаривании промышленными ферментами окраска может ос-

таваться светло-коричневой, однако вкус сусла после полного осахаривания должен быть уверенно сладкий, а его концентрация составлять 16-18%. Если осахаривание проходит плохо, необходимо более тонкое измельчение исходного сырья, повышение температуры и увеличение времени клейстеризации, лучшее перемешивание замеса с ферментами или увеличение их количества. Для приготовления солодового молока берем 15 г размолотого солода и добавляем 200мл теплой воды при температуре 30 °С. Осахаренную массу готовим к сбраживанию. Для этого очень быстро ее охлаждают до температуры 28-30 °С и вносят дрожжевой затор, который готовится заранее. Пассивное охлаждение не допускается. Процесс быстрого охлаждения важен, т.к. его замедление способствует быстрому размножению бактерий в питательной осажаренной смеси. Для нормальной работы дрожжей требуется температура в пределах 28-30 °С. Понижение температуры замедляет процесс сбраживания, вплоть до его остановки, а повышение, способствует размножению диких дрожжей, которые в свою очередь уменьшают выход спиртов. Увеличение температуры сбраживания до 32°С, увеличивает коэффициент размножения диких дрожжей в 2-3 раза, при 37-38°С они размножаются в 6-8 раз быстрее. Дрожжи рекомендуется вносить не напрямую, а сделать предварительно дрожжевой затор. Для этого дрожжи разводятся в теплой воде, около 30°С. На килограмм прессованных дрожжей расходуется 10-14 л воды. Одновременно, обеспечивая активность дрожжевого затора, дрожжи можно предварительно разбродить. С этой целью в подготовленный дрожжевой затор вносится некоторое количество сахара (на 50-100 г дрожжей 5-10 г сахара). Все это перемешиваем, и дрожжевой разброженный затор, вливаем в сусло, охлажденное до 28-30 °С. Тщательно перемешиваем, и ставим на сбраживание в прохладном месте. Емкость герметично закрываем и ставим водяной затвор. Водяной затвор нужен для выпуска углекислого газа, который образуется при брожении при условии не попадания кислорода в бродильную емкость. Так как это вызовет окисление некоторых веществ и ухудшит качество напитка. Брожение имеет три стадии: начальное брожение-взбраживание, главное брожение и дображивание. В начальной стадии происходит насыщение бражки углекислым газом, темпера-

тура повышается на 2-3°C, вкус остается сладким. При главном брожении бражки начинается интенсивное выделение углекислого газа, на поверхности образуется пена, температура повышается до 30°C. В период брожения, важно, чтобы сусло не перегревалось. Оптимальное брожение происходит при 28-30°C. При дображивании уровень бражки понижается, пена оседает, температура уменьшается до 25-26°C, вкус становится горько кислым. Конец брожения определяют по прекращению передвижения сброживаемой среды, окончанию выделения углекислого газа и просветлению бражки. Длительность брожения зависит от ряда факторов и колеблется в пределах от 3 до 20 суток. Зрелая бражка обычно имеет кислотность рН 4,9-5,2 и является многокомпонентной смесью, содержащей (в %): воды 82-90, сухих веществ 4-10, этилового спирта 5-12, остаточных сахаров не более 0,45 и сопутствующих примесей до 0,05. Качественный состав бражки может изменяться в зависимости от вида и качества исходного сырья и соблюдения технологии его переработки. Концентрацию спирта в бражке определяют в дистилляте, полученном после отгонки. Если провести теоретические расчеты химических преобразований крахмала в сахар, а сахара в спирт, то получим следующие результаты:

$(C_6H_{10}O_5)_n + n \cdot H_2O + \text{ФЕРМЕНТ (солодовое молоко)} = n \cdot C_6H_{12}O_6$  ►  
1кг крахмала => 1,11кг сахара;

$C_6H_{12}O_6 + \text{дрожжи} = 2 \cdot C_2H_5OH + 2 \cdot CO_2$  ► 1кг сахара => 0,511кг (или 0,64л) спирта.

Зная содержание сахара или крахмала в любом сырье, можно легко рассчитать теоретический выход спирта из него. Например, если в пшенице 60% крахмала, то из 1кг этого зерна можно получить: 1кг пшеницы => 0,6кг крахмала =>  $0,6 \times 1,11 = 0,67$ кг сахара =>  $0,67 \times 0,64 = 0,426$ л спирта.

Результаты таких расчетов для усредненных значений сахаристости и крахмальности для некоторых основных видов сырья приведены в таблице 11.

Перегонку бражки осуществляют с помощью перегонного аппарата. Перегонную колбу заполняем не более чем на 2/3 от общего объема для предотвращения выброса пены в отбор.

Таблица 11 - Содержание спирта в сырье

Крахмалосодержащие		Сахаросодержащие	
сырье	спирт, мг/л	сырье	спирт, мг/л
Крахмал	710	Меласса 50%	320
Рис	530	Свекла 16%	102
Кукуруза	450	Яблоки	65
Пшеница	430	Смородина черная	54
Бобы	390	Сахар	640
Пшено	380		
Рожь	360		
Ячмень	350		
Лвес	280		
Горох	240		
Картофель 20%	110		

До момента закипания процесс нагрева проводится максимально быстро, но при первых признаках кипения бражки, температуру уменьшаем. Содержание спирта определяют ареометрическим или пикнометрическим способом.

### **Работа №11. Изучение методов определения этилового спирта в продукции**

**Цель работы:** приобрести навыки определения объёмной доли спирта в спиртосодержащих продуктах ареометрическим и пикнометрическим методами.

Приборы и реактивы: установка для перегонки бражки (плитка, приёмная колба на 250 см<sup>3</sup>, перегонная колба на 1000 см<sup>3</sup>, холодильник, каплеуловитель, кристаллизатор), термометр, пикнометр, цилиндр на 250 см<sup>3</sup>.

#### ***Методические аспекты проведения работы***

Количественное определение этилового спирта в различных объектах -одна из основных задач химико-технологического контроля бродильных производств. Неточное определение спирта может привести к выпуску нестандартной продукции, неправиль-

ному учету выпуска продукции и расхода сырья. Определение концентрации этилового спирта можно проводить различными методами: рефрактометрическим, газохроматографическим, пикнометрическим, ареометрическим и другими

*Ареометрический метод определения концентрации этилового спирта* основан на измерении объемной доли этилового спирта в дистилляте, полученном после перегонки спирта из исследуемого образца. Объемная доля этилового спирта определяется по относительной плотности водно-спиртового раствора (дистиллята) с помощью ареометра для спирта (спиртометров, показания которого основаны на зависимости между относительной плотностью водно-спиртового раствора и содержанием в нем этилового спирта). Объемную долю спирта (концентрацию) выражают в процентах, которые показывают количество объемных частей спирта в 100 объемных частях водно-спиртового раствора при температуре 20°C. Пикнометрический метод определения концентрации этилового спирта Пикнометрический метод основан на измерении плотности водно-спиртового раствора и состоит из следующих этапов:

- получение дистиллята,
- тарирование пикнометра,
- определение с помощью пикнометра плотности дистиллята (при 20°C),
- нахождение при помощи таблицы концентрации этилового спирта в продукте.

Сравниваем результаты определения крепости бражки, полученной из крахмалосодержащего сырья ареометрическим и пикнометрическим методом.

#### *Проведение анализа*

По окончании сбраживания крахмалосодержащего сырья определяем содержание спирта в бражке. Для получения дистиллята из полученной бражки необходимо собрать установку (рисунок 1).

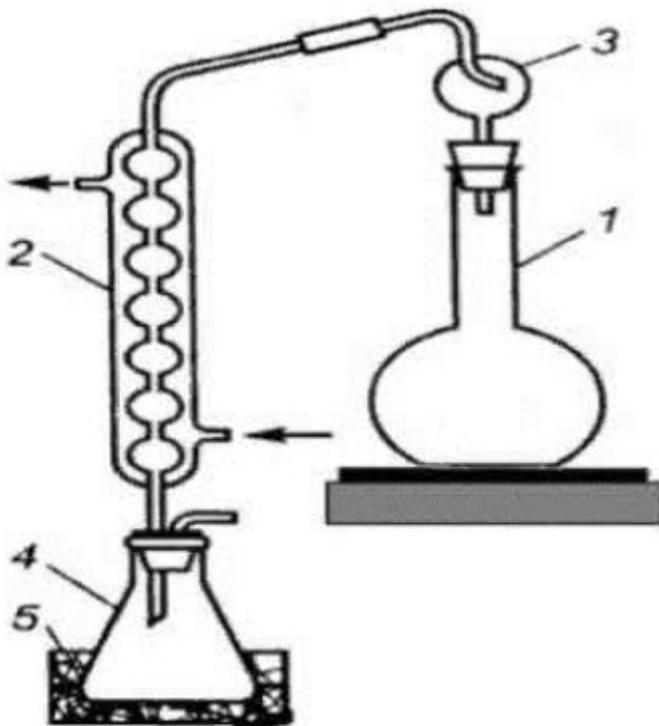


Рисунок 1 - Установка для отгонки спирта: 1-плоскодонная перегонная колба, 2-холодильник, 3-каплеуловитель, 4-приемная колба, 5-сосуд с холодной водой (кристаллизатор)

Затем довести анализируемый спиртосодержащий продукт до  $20^{\circ}\text{C}$ ;

- наполнить мерную колбу на  $250\text{cm}^3$  анализируемым раствором до метки;

- количественно перенести содержимое мерной колбы в перегонную колбу (для этого перелить содержимое мерной колбы в перегонную, ополоснуть мерную колбу 3 раза дистиллированной водой, сливая воду в перегонную колбу);

- в мерную колбу, которая будет служить приемной, поместить  $10-15\text{cm}^3$  дистиллированной воды и погрузить в нее узкий конец стеклянной трубки холодильника, затем колбу поместить в кристаллизатор с холодной водой;

- перегонную колбу соединить через каплеуловитель с холодильником и поместить ее на электроплитку;

- когда приемная колба наполнится примерно на  $3/4$  объема, закончить перегонку - измерить температуру полученного дистил-

лята (если температура отличается от 20°C, то нужно либо довести температуру до требуемой, либо затем внести поправку в соответствии с таблицей) и довести содержимое колбы до метки дистиллированной водой;

- вылить содержимое колбы в цилиндр на 250 см<sup>3</sup> и с помощью ареометра определить концентрацию спирта в исходном растворе - через 3 минуты снимаем отсчет показаний ареометра и записываем их;

- ареометр должен плавать в растворе, не касаясь стенок цилиндра;

- вынуть ареометр из жидкости, осторожно обтереть льняным полотенцем и поместить в футляр;

- измерить температуру дистиллята, находящего в цилиндре.

Зная показания ареометра и термометра по специальным таблицам находим крепость водно-спиртового раствора.

### **Контрольные вопросы**

1. Какова технология подготовки гидролизного сусле для процесса брожения?

2. Каковы возможные пути утилизации лигнина с помощью современных способов биоконверсии?

3. Назовите основные этапы получения биоэтанола из различных отходов растительного сырья?

4. Дайте краткую характеристику основных продуктов ферментативной и микробной биоконверсии?

5. Каковы перспективы развития биоконверсии в области интенсификации биопроцессов и повышения потенциала биологических агентов.

6. На чем основан принцип ареометрического и пикнометрического методов определения содержания этанола?

## Рекомендательный список литературы

1. Биоконверсия растительного сырья : учебное пособие / Т. А. Никифорова, Е. В. Волошин. — Оренбург : Оренбургский государственный университет, ЭБС АСВ, 2017. — 130 с. — URL: <https://www.iprbookshop.ru/epd-reader?publicationId=71264> (дата обращения: 01.10.2021). — Режим доступа: по подписке. - Текст: электронный.

2. Исаева, Е. В. Химия растительного сырья : учебное пособие / Е. В. Исаева, О. Н. Еременко, И. С. Почкутов. — Красноярск : Сибирский государственный университет науки и технологий имени академика М. Ф. Решетнева, 2018. — 90 с. — URL: <https://www.iprbookshop.ru/epd-reader?publicationId=94921> (дата обращения: 29.09.2021). — Режим доступа: по подписке. - Текст: электронный.

3. Ерёменко, О. Н. Технология подготовки растительного сырья для биоконверсии : учебное пособие / О. Н. Ерёменко, Е. В. Исаева, И. С. Почкутов. — Красноярск : Сибирский государственный университет науки и технологий имени академика М. Ф. Решетнева, 2018. — 92 с. — URL: <https://www.iprbookshop.ru/epd-reader?publicationId=94914> (дата обращения: 01.10.2021). — Режим доступа: по подписке. - Текст: электронный.

4. Гидролиз растительного сырья : учебное пособие / Р. Т. Валеева, Г. А. Гадельшина, С. Г. Мухачев [и др.]. — Казань : Казанский национальный исследовательский технологический университет, 2015. — 88 с. — URL: <https://www.iprbookshop.ru/epd-reader?publicationId=62161> (дата обращения: 01.10.2021). — Режим доступа: по подписке. - Текст: электронный.

5. Орловская, Т. В. Анализ пищевого растительного сырья : учебное пособие / Т. В. Орловская, И. А. Беляева, Т. В. Калашнова. — Ставрополь : Северо-Кавказский федеральный университет, 2015. — 141 с. — URL: <https://www.iprbookshop.ru/epd-reader?publicationId=62921> (дата обращения: 01.10.2021). — Режим доступа: по подписке. - Текст: электронный.