

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Методические указания

по выполнению лабораторных работ

по дисциплине «**Виды, использование и регенерация питательных сред**»

для студентов направления подготовки /специальности

19.03.01 - Биотехнология

Направленность (профиль) Промышленная биотехнология

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №1.

ТЕМА: ПРИГОТОВЛЕНИЕ ЖИДКОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ МИКРОБОВ: МЯСНАЯ ВОДА, МЯСО-ПЕПТОННЫЙ БУЛЬОН, ПЕРЕВАР ПО ХОТТИНГЕРУ.

Цель: освоение современных биотехнологических приемов приготовления и контроля качества питательных сред.

Формируемые компетенции:

ПК-1 – способность участвовать в разработке и проектировании технологических процессов согласно принятой в организации технологии производства пищевой и биотехнологической продукции с использованием современных систем автоматизированного проектирования.

ИД-1 ПК-1 Имеет представление о технологии производства и организации производственных и технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-2 ПК-1 Имеет представление об основе технологии производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-3 ПК-1 Может осуществлять входной и технологический контроль качества сырья, полуфабрикатов и готовой продукции для организации рационального ведения технологического процесса производства в целях разработки мероприятий по повышению эффективности производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-4 ПК-1 Использует методы проведения расчетов для проектирования производств биотехнологической продукции для пищевой промышленности, технологических линий, цехов, отдельных участков организаций с использованием систем автоматизированного проектирования и программного обеспечения, информационных технологий при создании проектов вновь строящихся и реконструкции действующих организаций.

ИД-5 ПК-1 Проводит основные технологические процессы производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-6 ПК-1 Осуществляет учет сырья и готовой продукции на базе стандартных и сертификационных испытаний производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности в целях обеспечения нормативов выхода готовой продукции в соответствии с технологическими инструкциями.

ИД-7 ПК-1 Учитывает показатели эффективности технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

Ход работы и фиксация результатов:

Тема: Приготовление жидкой питательной среды для микробов.

Мясная вода, мясо-пептонный бульон.

Белковой основой всех сред является питательный бульон. В зависимости от состава среды остальные ингредиенты добавляются к питательному бульону.

Существуют два способа приготовления основного питательного бульона:

1. на мясной воде с добавлением готового пептона, который представляет собой смесь разнообразных частиц распада белка, не свернувшихся при нагревании (частицы альбумозы, пептоны, пептиды и незначительное количество аминокислот). Это так называемый мясо-пептонный бульон
2. на переварах, продуктах гидролиза исходного сырья при помощи ферментов (трипсина - бульон Хоттингера, пепсина - бульон Мартена) или кислот; среды этой группы богаче аминокислотами.

От азотистого состава мясо-пептонных сред и от степени расщепления белка в мясных и прочих гидролизатах зависит содержание в среде общего и аминного азота. Отношение количества аминного азота к количеству общего выражает степень расщепления общего азота. Обычно эта величина выражается в процентах. При изготовлении питательных сред необходимо определять количество общего и аминного азота как основных показателей качества.

Для хорошего роста большинства микробов необходимо содержание в 100 мл бульона не менее 250—300 мг общего азота при наличии в этом количестве аминокислот (аминокислот) в среднем в пределах 25—30%. Принимая во внимание, что для приготовления питательного бульона полуфабрикаты разводят в несколько раз, необходимо доводить гидролиз основного сырья (мяса, казеина и прочих субстратов) до максимального накопления общего азота.

Полуфабрикаты и основные питательные среды из них

Мясная вода. Мясо, очищенное от жира и сухожилий, пропускают через мясорубку и заливают двойным количеством холодной водопроводной воды, т. е. на 1 кг мяса берут 2 л воды. При желании уменьшить объем мясной воды (для хранения) можно мясо и воду взять в отношении 1:1. Такую концентрированную мясную воду в дальнейшем для приготовления бульона надо развести в 2 раза. Если мясо низкого качества, то последующего разведения не требуется. Мясную воду вместе с мясом ставят на огонь и кипятят в течение 1 часа. Накипь снимают шумовкой до начала кипения. Настаивание мясной воды с мясом продолжительное время до кипячения не рекомендуется во избежание размножения бактерий. Лишь в тех случаях, когда требуется сброженная мясная вода, целесообразно настаивать мясную воду на мясе в течение 18—20 часов. Развивающиеся бактерии в той или другой степени сбраживают содержащийся в мясе гликоген. По окончании кипения дают мясной воде немного отстояться, фильтруют ее через полотно или фильтровальную бумагу, доливают водопроводной водой до первоначального объема, разливают по бутылкам и стерилизуют при давлении в 1 атм. (120 °) 30 минут. После стерилизации на стенках бутылки и на дне получается осадок из свернувшихся белков. Поэтому перед приготовлением бульона мясную воду снова фильтруют. Мясная вода (мясной экстракт) содержит минеральные вещества, белки, углеводы, витамины.

Ход работы:

Мясо перемалываем, взвешиваем 100 г. фарша и кладем в кастрюлю. Мерным цилиндром (100 мл.) добавляем 200 мл воды, затем ставим на комфорку и доводим до кипения. Кипятим 30 мин и фильтруем бульон через марлевый фильтр.

Тема: Приготовление жидкой питательной среды для микробов: перевар по Хоттингеру.

Перевар по Хоттингеру. 1 кг мяса, очищенного от жира и сухожилий, нарезают кусками примерно 1—2 см. Мясо опускают не большими порциями в кастрюлю с двойным количеством (по отношению к мясу) кипящей водопроводной воды; кипятят 15—20 минут, пока мясо не станет серым, что указывает на то, что белки свернулись. Мясо вынимают шумовкой и пропускают его через мясорубку. Устанавливают в жидкости рН 8,0. Опускают фарш в жидкость и охлаждают до 40° в открытой кастрюле, затем добавляют поджелудочную железу (очищенную от жира, соединительной ткани и дважды пропущенную через мясо рубку) в количестве 10% к взятой жидкости (на 1 л жидкости 100 г железы) или сухой панкреатин в количестве 0,5% и выше в зависимости от его активности. Хорошо размешивают, после чего снова подщелачивают смесь до рН 7,8-8,0 и повторяют такое подщелачивание через 30 минут. Отсутствие сдвига реакции смеси в сторону окисления указывает на недоброкачественность фермента. После установления рН смесь переливают в бутылку с плотной резиновой пробкой с таким расчетом, чтобы 1/3 бутылки оставалась свободной. Добавляют 1-3% хлороформа 10-30 мл на 1 л жидкости (в холодное время года меньше, чем в теплое), закрывают бутылку пробкой и несколько раз встряхивают так, чтобы хлороформ перемешался от дна бутылки к пробке и обратно, после чего на минуту вынимают пробку для освобождения от избытка паров хлороформа. Через 1-2 часа после добавления фермента опять проверяют реакцию и устанавливают рН 7,4-7,6. При этой реакции оставляют смесь для переваривания на 7-10-16 дней при комнатной температуре. Первые 3-4 дня переваривания ежедневно проверяют и исправляют реакцию. В эти дни также встряхивают перевар не менее 3 раз в сутки. В дальнейшем проверку реакции производить нецелесообразно, а встряхивать можно, реже; за 1-2 дня до окончания переваривания встряхивания совсем прекращают, чтобы перевар отстоялся. Конец переваривания характеризуется следующими признаками:

- 1) на дне бутылки собирается пылевидный осадок;
- 2) жидкость над осадком просветляется и принимает соломенно-желтый цвет;
- 3) перевар легко фильтруется;

4) реакция на триптофан с бромной водой должна быть положительной (в пробирку наливают 3-4 мл фильтрованного перевара, добавляют 3—4 капли бромной воды); при наличии триптофана жидкость принимает розово-фиолетовый цвет (сравнивают с контрольной пробиркой, где к перевару не прибавлена бромная вода);

5) гидролизат перевара доведен до содержания в нем 1100—1200 мг % общего азота.

По окончании гидролиза перевар фильтруют через полотняный или бумажный фильтр; разливают в бутылки и стерилизуют 30 минут при давлении 1 атм. (120 °) для хранения впрок. Перед употреблением фильтруют.

Ход работы:

К 30 мл мясного бульона добавляют 0,5 г панкреатина, ставят колбу на водяную баню и доводят до кипения, затем охлаждают под струей холодной воды и подщелачивают 0,1 раствором NaOH до pH 7,8- 8,0. Добавляют 0,5 мл хлороформа под вытяжкой, хорошо закрывают резиновой пробкой и встряхивают. Затем под вытяжкой открывают колбу и оставляют на 30 минут выветриваться хлороформу при помешивании через 10 мин. Затем проверяют кислотность среды до pH 7,4- 7,6. Разливают по пробиркам, ставят в холодильник.

Результаты:

Оборудование и материалы:

1. Выход в Интернет и университетскую сеть в лекционных, лабораторных, компьютерных аудиториях;
2. Мультимедийный проектор;
3. Ноутбук;
4. Текстовые и электронные ресурсы Научной библиотеки университета;
5. Наборы реактивов для проведения анализа образцов;
6. Бета-радиометр и нитратометр «SoEx»;
7. Исследуемые образцы питательных сред и их компонентов.

Указания по технике безопасности:

Правила по технике безопасности для работы в специализированной лаборатории (корпус «К», экспериментальный цех), оснащенной необходимыми приборами и оборудованием, а также на филиале кафедры, расположенном на молочном комбинате «Ставропольский», где имеется специализированная аудитория для лабораторных занятий.

Содержание отчета: При подготовке к лабораторным занятиям необходимо изучить лекционный материал, дополнительные источники литературы, рекомендованные преподавателем, а также самостоятельно подготовить ответы на вопросы к защите ЛАБОРАТОРНЫХ работ и выполнить задания по теме занятия.

Список литературы, рекомендуемый к использованию по данной теме:

Перечень основной литературы:

1. Залашко М.В. Биотехнология переработки молочной сыворотки. М.: В.О. «Агропромиздат». – 1990. – 192 с.
2. Залашко М.В., Залашко Л.С. Микробный синтез на молочной сыворотке. Минск: Наука и техника. –1990. –274 с.
3. Сидоров М.С., Корнелаева Р.П. Микробиология мяса и мясопродуктов. М.: Колос. –1996. –240 с.
4. Тутов И.К., Ситьков В.И. Основы биотехнологии ветеринарных биопрепаратов. Ставрополь: 1997. –253 с.

Перечень дополнительной литературы:

1. Баснакьян И.А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами.. М.: Медицина. –1992. –192 с.

2. Безбородов А.М. Биосинтез биологически активных веществ микроорганизмами. М.: Медицина. –1969. –246 с.
3. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. М.: Медицина. – 1973. – 456 с.
4. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. М.: Изд-во МГУ. -1989. –294 с.
5. Иванов В.Н. Энергетика роста микроорганизмов. Киев: Наукова думка. –1981. – 140 с.
6. Коротяев А.И. Механизмы саморегуляции бактериальной клетки. М.: Медицина. – 1973. –272 с.
7. Козлов Ю.А. Питательные среды в медицинской биологии. М.: МЕДГИЗ – 1950 – 252 с.
8. Месробяну Л., Пуэнеску Э. Физиология бактерий. Бухарест: Меридиане. –1963. – 807 с.
9. Мосичев М.С., Складнев А.А., Котов Б.В. Общая технология микробиологических производств. М.: Легкая и пищевая промышленность. –1982. – 264 с.
10. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир. – 1978. –331 с.
11. Практикум по физико-химическим методам в биологии. М.: Изд-во МГУ. –1981. –240 с.
12. Руководство по вакцинному и сывороточному делу. Под ред. Бургасова П.Н. М.: Медицина. –1978. –440 с.
13. Уэбб Ф. Биохимическая технология и микробиологический синтез. Пер. с англ. Швалева П.Е. М.: Медицина. –1969. –560 с.

Методическая литература:

1. Методические указания к лабораторным работам по дисциплине «Виды, использование и регенерация питательных сред».

Интернет-ресурсы:

1. <http://biblioclub.ru> : [ЭБС «Университетская библиотека ONLINE»];
2. <http://diss.rsl.ru> : [Электронная библиотека диссертаций РГБ];
3. <http://e.lanbook.com> : [ЭБС издательства «Лань»];
4. <http://elibrary.ru> : [Научная электронная библиотека eLIBRARY.RU];
5. <http://uisrussia.msu.ru> : [Университетская информационная система РОССИЯ (УИС РОССИЯ)].

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №2.

ТЕМА: ПЛОТНЫЕ ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ, НА ОСНОВЕ АГАР-АГАРА ИЛИ ЖЕЛАТИНА И СУХИЕ ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ: СУХОЙ ПИТАТЕЛЬНЫЙ АГАР И АГАР «Д» С ДРОЖЖЕВЫМ ЭКСТРАКТОМ.

Цель: освоение современных биотехнологических приемов приготовления и контроля качества питательных сред.

Формируемые компетенции:

ПК-1 – способность участвовать в разработке и проектировании технологических процессов согласно принятой в организации технологии производства пищевой и биотехнологической продукции с использованием современных систем автоматизированного проектирования.

ИД-1 ПК-1 Имеет представление о технологии производства и организации производственных и технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-2 ПК-1 Имеет представление об основе технологии производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-3 ПК-1 Может осуществлять входной и технологический контроль качества сырья, полуфабрикатов и готовой продукции для организации рационального ведения технологического процесса производства в целях разработки мероприятий по повышению эффективности производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-4 ПК-1 Использует методы проведения расчетов для проектирования производств биотехнологической продукции для пищевой промышленности, технологических линий, цехов, отдельных участков организаций с использованием систем автоматизированного проектирования и программного обеспечения, информационных технологий при создании проектов вновь строящихся и реконструкции действующих организаций.

ИД-5 ПК-1 Проводит основные технологические процессы производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-6 ПК-1 Осуществляет учет сырья и готовой продукции на базе стандартных и сертификационных испытаний производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности в целях обеспечения нормативов выхода готовой продукции в соответствии с технологическими инструкциями.

ИД-7 ПК-1 Учитывает показатели эффективности технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

Ход работы и фиксация результатов:

Тема: Плотные питательные среды и сухие питательные среды.

Плотные питательные среды

Питательные свойства плотной среды зависят исключительно от состава питательного бульона, из которого она изготовлена путем добавления агар-агара или желатины. Последние служат как желирующие вещества для создания плотности среды.

К мясо-пептонному бульону (МПБ) или бульону Хоттингера (рН 8,2—8,4) добавляют 2—2,5% отечественного или 2% импортного мелко нарезанного агар-агара. К дрожжевому аутолизату необходимо добавить и 0,5% поваренной соли. Концентрация агара в большой степени зависит от качества агар-агара.. Поэтому при употреблении новой партии агара необходимо проверить его желирующую способность. Если агар влажный, его следует до употребления подсушить.

Кастрюлю с бульоном и агаром ставят на огонь и кипятят до полного растворения агара. Во время кипячения необходимо все время помешивать во избежание пригорания. По окончании кипячения следует восстановить объем среды добавлением горячей дистиллированной воды. Проверяют и, если нужно, исправляют реакцию. При определении реакции в агаре или желатине температура этих сред должна быть не ниже 80°, так же как и температура воды, прибавляемой в пробирки компаратора. В противном случае агар или желатина очень быстро становятся плотными, что затрудняет определение. После установления реакции агар кипятят. Дают ему отстояться в теплом месте, после чего фильтруют в горячем состоянии через ватно-марлевый фильтр. Осадок на фильтр не выливают. Разливают в посуду, стерилизуют под давлением 1 атм. в течение 30 минут.

При приготовлении больших количеств агара (более 10 л) можно пользоваться другим способом его варки: кастрюлю с агар-агаром на любой питательной основе

помещают в автоклав под текущий пар (100°) на 1 час. Текущим паром можно варить агар также в текучепаровом аппарате. Затем оставляют для медленного и равномерного оттаивания в теплом месте (можно оставить в автоклаве с потушенной горелкой) на 1 час, после чего проверяют реакцию, исправляют ее и фильтруют.

Можно после оттаивания дать агару застыть и на другой день срезать и удалить нижнюю его часть с осадком. Прозрачный слой измельчают ножом и расплавляют текущим паром при 100° (1- 1, 1½ часа), после чего устанавливают реакцию и фильтруют. Если после расплавления срезанного агара в нем будет заметна муть, дают ему вновь отстояться в теплом месте, после чего осторожно сливают с осадка. Надо избегать подщелачивания готового агара, так как не исключена возможность выпадения осадка после подщелачивания при последующей стерилизации.

Прозрачный и светлый агар получают также путем просветления его яичным белком или кровяной сывороткой. На каждые 1—2 л агара, остуженного до 50 °, прибавляют белок одного куриного яйца или 25—50 мл кровяной сыворотки. Яичный белок нужно предварительно хорошо размешать с двойным объемом холодной воды. Употребляют только свежие яйца, в противном случае агар может сделаться еще более мутным. После прибавления белка или сыворотки агар тщательно размешивают и кипятят 10—15 минут на огне. Добавленный белок свертывается и адсорбирует взвешенные частицы. Крупнохлопчатый осадок легко отделяется фильтрованием. Фильтрованный агар разливают в посуду, стерилизуют в автоклаве под давлением 1 атм. в течение 30 минут. После стерилизации питательный агар, разлитый в пробирки, оставляют застыть столбиком, если он приготовлен не для немедленного использования, или скашивают (косой агар) для непосредственного употребления. Для скашивания пробирки с горячим агаром укладывают на покатой поверхности или под верхнюю часть пробирок подкладывают резиновую или стеклянную трубку. После остывания на агаровой среде собирается конденсационная жидкость, которая сохраняется некоторое время, если среду хранить в прохладном месте.

Рост микробов на влажном агаре лучше, чем на сухом. Последний следует расплавить и дать ему снова застыть, тогда выделится снова конденсационная вода. Однако многократное кипячение агара и особенно стерилизация снижают его плотность.

Для разливки в чашки Петри пользуются агаром из флаконов или пробирок. Непосредственно перед разливкой агар следует растопить на водяной бане или текучепаровом аппарате, а затем остудить до 50-55°. Чашки Петри должны быть стерильны. Срок годности чашек со средой до 48 часов. Хранить их следует на холоде.

Ход работы:

Наливают в пробирку мясо-пептонный бульон (1/2 пробирки), затем добавляют в нее 2% сухой агар-агар (предварительно замоченный в воде или бульоне до 2/3 объема пробирки). Смесь кипятят на водяной бане до полного растворения при помешивании, охлаждают пробирку в воде. Пробирки подписывают. Ставят в штатив в холодильник.

Результаты:

Сухие питательные среды

В последние годы в бактериологии широко пользуются сухими питательными средами. Это избавляет лаборатории от громоздкого процесса приготовления обычных сред, позволяет получать сравнимые результаты в разных лабораториях и, наконец, приближает к разрешению вопроса о стандартности питательных сред. Значение сухих сред возрастает в экспедиционных и полевых условиях.

Сухие питательные среды следует хранить герметически закрытыми и по возможности не на свету, так как препараты гигроскопичны и светочувствительны. Увлажнение, комкование и изменение цвета порошка свидетельствуют о понижении качества препарата. Сухие препараты, не содержащие глюкозы, даже при комковании

могут не терять своих качеств, однако их пригодность следует проверить. При наличии же в сухой среде глюкозы комкование и изменение цвета порошка свидетельствуют о порче.

Ход работы:

Технология приготовления питательных сред из сухих препаратов проста. Навеску, указанную на этикетке, всыпают в стеклянную колбу или бутылку с холодной дистиллированной водой. Смесь следует хорошо размешать до полного смачивания порошка водой. Затем в водяной бане или лучше в текуче-паровом аппарате смесь нагревают до кипения, периодически помешивая. Кипятят до тех пор, пока порошок окончательно не растворится. Растворение на голом огне возможно, но требует большого внимания, чтобы не допустить пригорания среды. Перед разливкой следует среду хорошо перемешать. Сухие среды выпускаются основные, элективные и дифференциальные.

Сухой питательный агар (рН 7,3—7,6). К растворенному сухому агару (5—7,5 г сухого агара на 100 мл) рекомендуется добавлять в качестве факторов роста небольшое количество дрожжевого аутолизата, мясной воды или неразведенного триптического перевара мяса (около 1/3 растворяющей жидкости). Для выявления валлообразования паратифозной В палочки, а также расщепления бактерий Зонне на круглые плоские варианты сухой агар растворяют дистиллированной водой, содержащей триптический перевар, в отношении 2:1. Если после растворения агар недостаточно прозрачен, его фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Разливают по пробиркам или флаконам. Стерилизуют под давлением 1 атм. в течение 20 минут.

Сухой питательный агар Д имеет в своем составе дрожжевой экстракт в качестве фактора роста. Прибавления дополнительных факторов роста не требуется. Способ приготовления не отличается от описанного для предыдущей среды.

Результаты:

Оборудование и материалы:

1. Выход в Интернет и университетскую сеть в лекционных, лабораторных, компьютерных аудиториях;
2. Мультимедийный проектор;
3. Ноутбук;
4. Текстовые и электронные ресурсы Научной библиотеки университета;
5. Наборы реактивов для проведения анализа образцов;
6. Бета-радиометр и нитратометр «SoEx»;
7. Исследуемые образцы питательных сред и их компонентов.

Указания по технике безопасности:

Правила по технике безопасности для работы в специализированной лаборатории (корпус «К», экспериментальный цех), оснащенной необходимыми приборами и оборудованием, а также на филиале кафедры, расположенном на молочном комбинате «Ставропольский», где имеется специализированная аудитория для лабораторных занятий.

Содержание отчета: При подготовке к лабораторным занятиям необходимо изучить лекционный материал, дополнительные источники литературы, рекомендованные преподавателем, а также самостоятельно подготовить ответы на вопросы к защите ЛАБОРАТОРНЫХ работ и выполнить задания по теме занятия.

Список литературы, рекомендуемый к использованию по данной теме:

Перечень основной литературы:

1. Залашко М.В. Биотехнология переработки молочной сыворотки. М.: В.О. «Агропромиздат». – 1990. – 192 с.
2. Залашко М.В., Залашко Л.С. Микробный синтез на молочной сыворотке. Минск: Наука и техника. –1990. –274 с.

3. Сидоров М.С., Корнелаева Р.П. Микробиология мяса и мясопродуктов. М.: Колос. –1996. –240 с.

4. Тутов И.К., Ситьков В.И. Основы биотехнологии ветеринарных биопрепаратов. Ставрополь: 1997. –253 с.

Перечень дополнительной литературы:

1. Баснакьян И.А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами.. М.: Медицина. –1992. –192 с.

2. Безбородов А.М. Биосинтез биологически активных веществ микроорганизмами. М.: Медицина. –1969. –246 с.

3. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. М.: Медицина. – 1973. – 456 с.

4. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. М.: Изд-во МГУ. -1989. –294 с.

5. Иванов В.Н. Энергетика роста микроорганизмов. Киев: Наукова думка. –1981. – 140 с.

6. Коротяев А.И. Механизмы саморегуляции бактериальной клетки. М.: Медицина. – 1973. –272 с.

7. Козлов Ю.А. Питательные среды в медицинской биологии. М.: МЕДГИЗ – 1950 – 252 с.

8. Месробяну Л., Пуэнеску Э. Физиология бактерий. Бухарест: Меридиане. –1963. – 807 с.

9. Мосичев М.С., Складнев А.А., Котов Б.В. Общая технология микробиологических производств. М.: Легкая и пищевая промышленность. –1982. – 264 с.

10. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир. – 1978. –331 с.

11. Практикум по физико-химическим методам в биологии. М.: Изд-во МГУ. –1981. –240 с.

12. Руководство по вакцинному и сывороточному делу. Под ред. Бургасова П.Н. М.: Медицина. –1978. –440 с.

13. Уэбб Ф. Биохимическая технология и микробиологический синтез. Пер. с англ. Швалева П.Е. М.: Медицина. –1969. –560 с.

Методическая литература:

1. Методические указания к лабораторным работам по дисциплине «Виды, использование и регенерация питательных сред».

Интернет-ресурсы:

1. <http://biblioclub.ru> : [ЭБС «Университетская библиотека ONLINE»];

2. <http://diss.rsl.ru> : [Электронная библиотека диссертаций РГБ];

3. <http://e.lanbook.com> : [ЭБС издательства «Лань»];

4. <http://elibrary.ru> : [Научная электронная библиотека eLIBRARY.RU];

5. <http://uisrussia.msu.ru> : [Университетская информационная система РОССИЯ (УИС РОССИЯ)].

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №3.

ТЕМА: КОНСЕРВАНТЫ И СРЕДЫ ОБОГАЩЕНИЯ: ГЛИЦЕРИНОВАЯ СМЕСЬ, ФОСФАТНАЯ БУФЕРНАЯ СМЕСЬ, ЖЕЛЧНЫЙ БУЛЬОН.

Цель: освоение современных биотехнологических приемов приготовления и контроля качества питательных сред.

Формируемые компетенции:

ПК-1 – способность участвовать в разработке и проектировании технологических процессов согласно принятой в организации технологии производства пищевой и биотехнологической продукции с использованием современных систем автоматизированного проектирования.

ИД-1 ПК-1 Имеет представление о технологии производства и организации производственных и технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-2 ПК-1 Имеет представление об основе технологии производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-3 ПК-1 Может осуществлять входной и технологический контроль качества сырья, полуфабрикатов и готовой продукции для организации рационального ведения технологического процесса производства в целях разработки мероприятий по повышению эффективности производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-4 ПК-1 Использует методы проведения расчетов для проектирования производств биотехнологической продукции для пищевой промышленности, технологических линий, цехов, отдельных участков организаций с использованием систем автоматизированного проектирования и программного обеспечения, информационных технологий при создании проектов вновь строящихся и реконструкции действующих организаций.

ИД-5 ПК-1 Проводит основные технологические процессы производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-6 ПК-1 Осуществляет учет сырья и готовой продукции на базе стандартных и сертификационных испытаний производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности в целях обеспечения нормативов выхода готовой продукции в соответствии с технологическими инструкциями.

ИД-7 ПК-1 Учитывает показатели эффективности технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

Ход работы и фиксация результатов:

Консерванты и среды обогащения

Для сохранения жизнеспособности дизентерийных бактерий в случаях, когда посев фекалий на питательные среды нельзя произвести непосредственно после забора материала, последний подлежит консервированию.

Глицериновая смесь является лучшим консервантом для дизентерийных бактерий. Смешивают 2 л физиологического раствора, 1 л глицерина и 20% раствор фосфорнокислого натрия (Na_2HPO_4) в таком количестве, чтобы довести pH смеси до 7,8—8,0 (ориентировочно на 3 л смеси берут 300 мл 20% раствора Na_2HPO_4 хорошо выветренного). Стерилизуют текучим паром 3 дня подряд или при давлении 0,5 атм. в течении 15-30 минут.

После стерилизации pH должен быть 7,8.

Фосфатная буферная смесь. На 1 л дистиллированной воды добавляют фосфорнокислого однозамещенного калия (KH_2PO_4) 0,45 г., фосфорнокислого двухзамещенного (выветренного) натрия (Na_2HPO_4) 5,34 г. Разливают, стерилизуют в автоклаве при давлении 1 атм. в течении 30 минут. Употребляют как консервант для патогенных микробов семейства кишечных.

Еще более эффективными являются среды, в которых патогенные кишечные бактерии не только сохраняются, но и размножаются, — так называемые среды обогащения. Большинство сред обогащения содержит желчь.

Желчный бульон. Свежую желчь крупного рогатого скота фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Рекомендуются предварительно ее нагревать текучим паром при 100 ° в течение 1 часа, затем до фильтрования дать отстояться. Фильтрованную горячую желчь разливают по бутылкам, стерилизуют текучим паром 3 дня подряд по 30 минут. Перед приготовлением желчного бульона желчь декантируют с осадка, фильтруют через ватную пробку (не очень плотную), вставленную в воронку, или через фильтровальную бумагу и соединяют с бульоном pH 7,2 (можно фильтровать

смесь), разливают по пробиркам, флаконам и стерилизуют текущим паром 3 дня подряд по 30 минут. Применяют 10—20% желчный бульон pH 7,5. Для разведения желчи можно употреблять вместо бульона 0,85% раствор поваренной соли (физиологический раствор).

Ход работы:

К готовому мясному бульону или физиологическому раствору (0,85 % Na Cl) добавляют 5 мл желчи, доводят до кипения на водяной бане, кипятят 30 минут, охлаждают под водой и разливают по пробиркам и закупоривают. Физиологический раствор готовится из расчета 100 мл дистиллированной воды на 0,85 г химически чистого Na Cl.

Результаты:

Оборудование и материалы:

1. Выход в Интернет и университетскую сеть в лекционных, лабораторных, компьютерных аудиториях;
2. Мультимедийный проектор;
3. Ноутбук;
4. Текстовые и электронные ресурсы Научной библиотеки университета;
5. Наборы реактивов для проведения анализа образцов;
6. Бета-радиометр и нитратометр «SoEx»;
7. Исследуемые образцы питательных сред и их компонентов.

Указания по технике безопасности:

Правила по технике безопасности для работы в специализированной лаборатории (корпус «К», экспериментальный цех), оснащенной необходимыми приборами и оборудованием, а также на филиале кафедры, расположенном на молочном комбинате «Ставропольский», где имеется специализированная аудитория для лабораторных занятий.

Содержание отчета: При подготовке к лабораторным занятиям необходимо изучить лекционный материал, дополнительные источники литературы, рекомендованные преподавателем, а также самостоятельно подготовить ответы на вопросы к защите ЛАБОРАТОРНЫХ работ и выполнить задания по теме занятия.

Список литературы, рекомендуемый к использованию по данной теме:

Перечень основной литературы:

1. Залашко М.В. Биотехнология переработки молочной сыворотки. М.: В.О. «Агропромиздат». – 1990. – 192 с.
2. Залашко М.В., Залашко Л.С. Микробный синтез на молочной сыворотке. Минск: Наука и техника. –1990. –274 с.
3. Сидоров М.С., Корнелаева Р.П. Микробиология мяса и мясопродуктов. М.: Колос. –1996. –240 с.
4. Тутов И.К., Ситьков В.И. Основы биотехнологии ветеринарных биопрепаратов. Ставрополь: 1997. –253 с.

Перечень дополнительной литературы:

1. Баснакян И.А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами.. М.: Медицина. –1992. –192 с.
2. Безбородов А.М. Биосинтез биологически активных веществ микроорганизмами. М.: Медицина. –1969. –246 с.
3. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. М.: Медицина. – 1973. – 456 с.
4. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. М.: Изд-во МГУ. -1989. –294 с.
5. Иванов В.Н. Энергетика роста микроорганизмов. Киев: Наукова думка. –1981. – 140 с.

6. Коротяев А.И. Механизмы саморегуляции бактериальной клетки. М.: Медицина. – 1973. – 272 с.
7. Козлов Ю.А. Питательные среды в медицинской биологии. М.: МЕДГИЗ – 1950 – 252 с.
8. Месробяну Л., Пуэнеску Э. Физиология бактерий. Бухарест: Меридиане. –1963. – 807 с.
9. Мосичев М.С., Складнев А.А., Котов Б.В. Общая технология микробиологических производств. М.: Легкая и пищевая промышленность. –1982. – 264 с.
10. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир. – 1978. –331 с.
11. Практикум по физико-химическим методам в биологии. М.: Изд-во МГУ. –1981. –240 с.
12. Руководство по вакцинному и сывороточному делу. Под ред. Бургасова П.Н. М.: Медицина. –1978. –440 с.
13. Уэбб Ф. Биохимическая технология и микробиологический синтез. Пер. с англ. Швалева П.Е. М.: Медицина. –1969. –560 с.

Методическая литература:

1. Методические указания к лабораторным работам по дисциплине «Виды, использование и регенерация питательных сред».

Интернет-ресурсы:

1. <http://biblioclub.ru> : [ЭБС «Университетская библиотека ONLINE»];
2. <http://diss.rsl.ru> : [Электронная библиотека диссертаций РГБ];
3. <http://e.lanbook.com> : [ЭБС издательства «Лань»];
4. <http://elibrary.ru> : [Научная электронная библиотека eLIBRARY.RU];
5. <http://uisrussia.msu.ru> : [Университетская информационная система РОССИЯ (УИС РОССИЯ)].

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №4.

ТЕМА: ХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД: ОТЛИЧИТЕЛЬНЫЕ ПРИЗНАКИ И ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ АЛЬБУМОЗ И ПЕПТОНОВ.

Цель: освоение современных биотехнологических приемов приготовления и контроля качества питательных сред.

Формируемые компетенции:

ПК-1 – способность участвовать в разработке и проектировании технологических процессов согласно принятой в организации технологии производства пищевой и биотехнологической продукции с использованием современных систем автоматизированного проектирования.

ИД-1 ПК-1 Имеет представление о технологии производства и организации производственных и технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-2 ПК-1 Имеет представление об основе технологии производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-3 ПК-1 Может осуществлять входной и технологический контроль качества сырья, полуфабрикатов и готовой продукции для организации рационального ведения технологического процесса производства в целях разработки мероприятий по повышению эффективности производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-4 ПК-1 Использует методы проведения расчетов для проектирования производств биотехнологической продукции для пищевой промышленности, технологических линий, цехов, отдельных участков организаций с использованием систем автоматизированного проектирования и программного обеспечения, информационных технологий при создании проектов вновь строящихся и реконструкции действующих организаций.

ИД-5 ПК-1 Проводит основные технологические процессы производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-6 ПК-1 Осуществляет учет сырья и готовой продукции на базе стандартных и сертификационных испытаний производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности в целях обеспечения нормативов выхода готовой продукции в соответствии с технологическими инструкциями.

ИД-7 ПК-1 Учитывает показатели эффективности технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

Ход работы и фиксация результатов:

Тема: Химическое исследование питательных сред.

Различные серии сред, изготовленные даже по одному и тому же рецепту, обладают различными питательными качествами. При изготовлении сред разведение перевара обычно определяют по количеству взятых для изготовления исходных продуктов (мяса, дрожжей и т. д.) без учета качества полученной мясной воды, перевара или пептона. Колебания химического состава питательных сред, несомненно, отражаются на интенсивности роста бактерий, токсинообразовании и пр. Для приготовления однородных питательных сред необходим химический контроль как за режимом гидролиза, так и за конечными продуктами (готовые питательные среды). Надо сказать, что этот раздел нельзя считать достаточно разработанным. В то же время сейчас представляется достаточно ясным, что каждая категория сред имеет свой химический состав. Лишь учитывая суммарные данные биохимических показателей и продуктивности среды, дают ей полноценный паспорт. Мы приводим наиболее распространенные методики.

Таблица 1. **Отличительные признаки и цветные реакции альбумоз и пептонов**

	Альбумозы		Пептоны
	первичные	вторичные	
Растворимость в воде при высоких температурах	Растворяются и не свертывается	Растворяются только в присутствии небольшого количества нейтральных солей	Растворяются и не свертываются
Нагревание в слегка подкисленной уксуснокислой среде	Нет свертывания	Нет свертывания	Нет свертывания

Сернистый аммоний	Осаждение после прибавления равного объема насыщенного раствора, слегка подкисленного уксусной кислотой	Осаждение при полном насыщении в слегка подкисленном уксусной кислотой растворе	Нет осадка
Азотная кислота	Осадок растворим при нагревании и вновь появляется при охлаждении	Нет осадка	Нет осадка
Железистосинеродистый калий и уксусная кислота	Нет осадка	Нет осадка	Нет осадка
Уксуснокислая медь	Синий осадок	Нет осадка	Нет осадка
Хлористая ртуть	Белый осадок	Белый осадок	Белый осадок
Пикриновая кислота (насыщенный раствор)	Желтый осадок	Желтый осадок	Желтый осадок в концентрированном растворе
Фосфорновольфрамовая кислота в сернистой среде	Белый осадок	Белый осадок	Белый осадок
Уксусный свинец	Синий осадок	Нет осадка	Нет осадка

Результаты:

Оборудование и материалы:

1. Выход в Интернет и университетскую сеть в лекционных, ЛАБОРАТОРНЫХ, компьютерных аудиториях;
2. Мультимедийный проектор;
3. Ноутбук;
4. Текстовые и электронные ресурсы Научной библиотеки университета;
5. Наборы реактивов для проведения анализа образцов;
6. Бета-радиометр и нитратометр «SoEx»;
7. Исследуемые образцы питательных сред и их компонентов.

Указания по технике безопасности:

Правила по технике безопасности для работы в специализированной лаборатории (корпус «К», экспериментальный цех), оснащенной необходимыми приборами и оборудованием, а также на филиале кафедры, расположенном на молочном комбинате «Ставропольский», где имеется специализированная аудитория для лабораторных занятий.

Содержание отчета: При подготовке к лабораторным занятиям необходимо изучить лекционный материал, дополнительные источники литературы, рекомендованные преподавателем, а также самостоятельно подготовить ответы на вопросы к защите ЛАБОРАТОРНЫХ работ и выполнить задания по теме занятия.

Список литературы, рекомендуемый к использованию по данной теме:

Перечень основной литературы:

1. Залашко М.В. Биотехнология переработки молочной сыворотки. М.: В.О. «Агропромиздат». – 1990. – 192 с.
2. Залашко М.В., Залашко Л.С. Микробный синтез на молочной сыворотке. Минск: Наука и техника. –1990. –274 с.
3. Сидоров М.С., Корнелеева Р.П. Микробиология мяса и мясопродуктов. М.: Колос. –1996. –240 с.

4. Тутов И.К., Ситьков В.И. Основы биотехнологии ветеринарных биопрепаратов. Ставрополь: 1997. –253 с.

Перечень дополнительной литературы:

1. Баснакьян И.А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами.. М.: Медицина. –1992. –192 с.

2. Безбородов А.М. Биосинтез биологически активных веществ микроорганизмами. М.: Медицина. –1969. –246 с.

3. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. М.: Медицина. – 1973. – 456 с.

4. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. М.: Изд-во МГУ. -1989. –294 с.

5. Иванов В.Н. Энергетика роста микроорганизмов. Киев: Наукова думка. –1981. – 140 с.

6. Коротяев А.И. Механизмы саморегуляции бактериальной клетки. М.: Медицина. – 1973. –272 с.

7. Козлов Ю.А. Питательные среды в медицинской биологии. М.: МЕДГИЗ – 1950 – 252 с.

8. Месробяну Л., Пуэнеску Э. Физиология бактерий. Бухарест: Меридиане. –1963. – 807 с.

9. Мосичев М.С., Складнев А.А., Котов Б.В. Общая технология микробиологических производств. М.: Легкая и пищевая промышленность. –1982. – 264 с.

10. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир. – 1978. –331 с.

11. Практикум по физико-химическим методам в биологии. М.: Изд-во МГУ. –1981. –240 с.

12. Руководство по вакцинному и сывороточному делу. Под ред. Бургасова П.Н. М.: Медицина. –1978. –440 с.

13. Уэбб Ф. Биохимическая технология и микробиологический синтез. Пер. с англ. Швалева П.Е. М.: Медицина. –1969. –560 с.

Методическая литература:

1. Методические указания к лабораторным работам по дисциплине «Виды, использование и регенерация питательных сред».

Интернет-ресурсы:

1. <http://biblioclub.ru> : [ЭБС «Университетская библиотека ONLINE»];

2. <http://diss.rsl.ru> : [Электронная библиотека диссертаций РГБ];

3. <http://e.lanbook.com> : [ЭБС издательства «Лань»];

4. <http://elibrary.ru> : [Научная электронная библиотека eLIBRARY.RU];

5. <http://uisrussia.msu.ru> : [Университетская информационная система РОССИЯ (УИС РОССИЯ)].

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №5.

ТЕМА: ИСПЫТАНИЕ КАЧЕСТВА ПЕПТОНА (ПО СХЕМЕ КАШИНЦЕВСКОЙ БИОФАБРИКИ): БИУРЕТОВАЯ РЕАКЦИЯ; НА ХЛОРИДЫ; НА ТЯЖЕЛЫЕ МЕТАЛЛЫ; НА ЗОЛЬНОСТЬ; НА СОДЕРЖАНИЕ ВЛАГИ; НА СВОБОДНЫЙ ИНДОЛ; НА ЦИСТИНОВУЮ ГРУППУ.

Цель: освоение современных биотехнологических приемов приготовления и контроля качества питательных сред.

Формируемые компетенции:

ПК-1 – способность участвовать в разработке и проектировании технологических процессов согласно принятой в организации технологии производства пищевой и биотехнологической продукции с использованием современных систем автоматизированного проектирования.

ИД-1 ПК-1 Имеет представление о технологии производства и организации производственных и технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-2 ПК-1 Имеет представление об основе технологии производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-3 ПК-1 Может осуществлять входной и технологический контроль качества сырья, полуфабрикатов и готовой продукции для организации рационального ведения технологического процесса производства в целях разработки мероприятий по повышению эффективности производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-4 ПК-1 Использует методы проведения расчетов для проектирования производств биотехнологической продукции для пищевой промышленности, технологических линий, цехов, отдельных участков организаций с использованием систем автоматизированного проектирования и программного обеспечения, информационных технологий при создании проектов вновь строящихся и реконструкции действующих организаций.

ИД-5 ПК-1 Проводит основные технологические процессы производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-6 ПК-1 Осуществляет учет сырья и готовой продукции на базе стандартных и сертификационных испытаний производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности в целях обеспечения нормативов выхода готовой продукции в соответствии с технологическими инструкциями.

ИД-7 ПК-1 Учитывает показатели эффективности технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

Ход работы и фиксация результатов:

Часть 1. Испытание качества пептона (по схеме Кашинцевской биофабрики)

Биуретовая реакция: При добавлении 5 капель крепкой азотной кислоты к 10 мл профильтрованного прозрачного 1 % раствора пептона не должна образовываться муть, нерастворимая при нагревании до 100 °. К 1 мл 5% раствора пептона добавляют 2 мл 25% раствора едкого натра, смешивают, добавляют 3 капли 5% раствора медного купороса и взбалтывают; раствор дает красно-фиолетовую окраску.

Результаты:

На хлориды: при добавлении к 10 мл 5% раствора пептона двух капель азотной кислоты и 1 мл раствора азотнокислого серебра допускается появление слабой опалесценции.

Результаты:

На тяжелые металлы: 10 мл 5% водного раствора пептона подкисляют 1 мл разбавленной соляной кислоты и прибавляют равный объем свежеприготовленной сероводородной воды; при этом не должно получаться желтого осадка или темного окрашивания жидкости.

Результаты:

На зольность: сжигают 2 г испытуемого пептона до полного озоления; остаток не должен превышать 0,1 г.

Результаты:

На содержание влаги: навеску пептона в 1 г высушивают при 100° до постоянного веса; после последнего взвешивания потеря в весе не должна превышать 0,07 г.

Результаты:

На свободный индол: к 10 мл 5% раствора испытуемого пептона прибавляют 2—3 мл амилового алкоголя, 1 мл азотнокислого калия в разведении 1: 100 и 1 мл химически чистой серной кислоты; не должно получиться розового окрашивания спиртового слоя.

Результаты:

На цистиновую группу: к 5 мл 5 % раствора пептона добавляют 5 мл 16% раствора едкого натра и 5 капель 10% раствора азотнокислого или уксуснокислого свинца и ставят пробирку на кипящую баню на 10 минут, причем происходит потемнение жидкости или выпадает черный осадок.

Результаты:

Оборудование и материалы:

1. Выход в Интернет и университетскую сеть в лекционных, лабораторных, компьютерных аудиториях;
2. Мультимедийный проектор;
3. Ноутбук;
4. Текстовые и электронные ресурсы Научной библиотеки университета;
5. Наборы реактивов для проведения анализа образцов;
6. Бета-радиометр и нитратометр «SoEx»;
7. Исследуемые образцы питательных сред и их компонентов.

Указания по технике безопасности:

Правила по технике безопасности для работы в специализированной лаборатории (корпус «К», экспериментальный цех), оснащенной необходимыми приборами и оборудованием, а также на филиале кафедры, расположенном на молочном комбинате «Ставропольский», где имеется специализированная аудитория для лабораторных занятий.

Содержание отчета: При подготовке к лабораторным занятиям необходимо изучить лекционный материал, дополнительные источники литературы, рекомендованные преподавателем, а также самостоятельно подготовить ответы на вопросы к защите ЛАБОРАТОРНЫХ работ и выполнить задания по теме занятия.

Список литературы, рекомендуемый к использованию по данной теме:

Перечень основной литературы:

1. Залашко М.В. Биотехнология переработки молочной сыворотки. М.: В.О. «Агропромиздат». – 1990. – 192 с.
2. Залашко М.В., Залашко Л.С. Микробный синтез на молочной сыворотке. Минск: Наука и техника. –1990. –274 с.
3. Сидоров М.С., Корнелаева Р.П. Микробиология мяса и мясопродуктов. М.: Колос. –1996. –240 с.
4. Тутов И.К., Ситьков В.И. Основы биотехнологии ветеринарных биопрепаратов. Ставрополь: 1997. –253 с.

Перечень дополнительной литературы:

1. Баснакьян И.А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами.. М.: Медицина. –1992. –192 с.
2. Безбородов А.М. Биосинтез биологически активных веществ микроорганизмами. М.: Медицина. –1969. –246 с.
3. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. М.: Медицина. – 1973. – 456 с.
4. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. М.: Изд-во МГУ. -1989. –294 с.

5. Иванов В.Н. Энергетика роста микроорганизмов. Киев: Наукова думка. –1981. – 140 с.
6. Коротяев А.И. Механизмы саморегуляции бактериальной клетки. М.: Медицина. – 1973. –272 с.
7. Козлов Ю.А. Питательные среды в медицинской биологии. М.: МЕДГИЗ – 1950 – 252 с.
8. Месробяну Л., Пуэнеску Э. Физиология бактерий. Бухарест: Меридиане. –1963. – 807 с.
9. Мосичев М.С., Складнев А.А., Котов Б.В. Общая технология микробиологических производств. М.: Легкая и пищевая промышленность. –1982. – 264 с.
10. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир. – 1978. –331 с.
11. Практикум по физико-химическим методам в биологии. М.: Изд-во МГУ. –1981. –240 с.
12. Руководство по вакцинному и сывороточному делу. Под ред. Бургасова П.Н. М.: Медицина. –1978. –440 с.
13. Уэбб Ф. Биохимическая технология и микробиологический синтез. Пер. с англ. Швалева П.Е. М.: Медицина. –1969. –560 с.

Методическая литература:

1. Методические указания к лабораторным работам по дисциплине «Виды, использование и регенерация питательных сред».

Интернет-ресурсы:

1. <http://biblioclub.ru> : [ЭБС «Университетская библиотека ONLINE»];
2. <http://diss.rsl.ru> : [Электронная библиотека диссертаций РГБ];
3. <http://e.lanbook.com> : [ЭБС издательства «Лань»];
4. <http://elibrary.ru> : [Научная электронная библиотека eLIBRARY.RU];
5. <http://uisrussia.msu.ru> : [Университетская информационная система РОССИЯ (УИС РОССИЯ)].

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №6.

ТЕМА: ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЗОТА БЕЛКОВ ПО ТОПШТЕЙН.

Цель: освоение современных биотехнологических приемов приготовления и контроля качества питательных сред.

Формируемые компетенции:

ПК-1 – способность участвовать в разработке и проектировании технологических процессов согласно принятой в организации технологии производства пищевой и биотехнологической продукции с использованием современных систем автоматизированного проектирования.

ИД-1 ПК-1 Имеет представление о технологии производства и организации производственных и технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-2 ПК-1 Имеет представление об основе технологии производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-3 ПК-1 Может осуществлять входной и технологический контроль качества сырья, полуфабрикатов и готовой продукции для организации рационального ведения технологического процесса производства в целях разработки мероприятий по повышению эффективности производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-4 ПК-1 Использует методы проведения расчетов для проектирования производств биотехнологической продукции для пищевой промышленности, технологических линий, цехов, отдельных участков организаций с использованием систем автоматизированного проектирования и программного обеспечения, информационных технологий при создании проектов вновь строящихся и реконструкции действующих организаций.

ИД-5 ПК-1 Проводит основные технологические процессы производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-6 ПК-1 Осуществляет учет сырья и готовой продукции на базе стандартных и сертификационных испытаний производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности в целях обеспечения нормативов выхода готовой продукции в соответствии с технологическими инструкциями.

ИД-7 ПК-1 Учитывает показатели эффективности технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

Ход работы и фиксация результатов:

Определение азота белков по Топштейн (100): к 25 мл перевара или 2% раствора пептона в мерной колбе на 50 мл добавляют 10 мл раствора буфера с $\text{pH} = 4,7$ и нагревают на кипящей водяной бане. Если при нагревании не наблюдается свертывания белков, то, отметив отсутствие последних, раствор разбавляют по охлаждению водой до метки, взбалтывают и берут 20 мл этого раствора (что соответствует 10 мл исходного раствора) для определения азота альбумоз. Если же при нагревании раствора выпал осадок белка, то, разбавив его по охлаждению водой до метки, фильтруют раствор через сухой фильтр в колбу, отбрасывая первую порцию фильтрата. 2 мл фильтрата (1 мл исходного раствора) сжигают по Кьельдалю и определяют содержание азота; вычтя из общего азота азот фильтрата, находят азот белков.

Результаты:

Оборудование и материалы:

1. Выход в Интернет и университетскую сеть в лекционных, лабораторных, компьютерных аудиториях;
2. Мультимедийный проектор;
3. Ноутбук;
4. Текстовые и электронные ресурсы Научной библиотеки университета;
5. Наборы реактивов для проведения анализа образцов;
6. Бета-радиометр и нитратометр «SoEx»;
7. Исследуемые образцы питательных сред и их компонентов.

Указания по технике безопасности:

Правила по технике безопасности для работы в специализированной лаборатории (корпус «К», экспериментальный цех), оснащенной необходимыми приборами и оборудованием, а также на филиале кафедры, расположенном на молочном комбинате «Ставропольский», где имеется специализированная аудитория для лабораторных занятий.

Содержание отчета: При подготовке к лабораторным занятиям необходимо изучить лекционный материал, дополнительные источники литературы, рекомендованные преподавателем, а также самостоятельно подготовить ответы на вопросы к защите ЛАБОРАТОРНЫХ работ и выполнить задания по теме занятия.

Список литературы, рекомендуемый к использованию по данной теме:

Перечень основной литературы:

1. Залашко М.В. Биотехнология переработки молочной сыворотки. М.: В.О. «Агропромиздат». – 1990. – 192 с.
2. Залашко М.В., Залашко Л.С. Микробный синтез на молочной сыворотке. Минск: Наука и техника. –1990. –274 с.
3. Сидоров М.С., Корнелаева Р.П. Микробиология мяса и мясопродуктов. М.: Колос. –1996. –240 с.
4. Тутов И.К., Ситьков В.И. Основы биотехнологии ветеринарных биопрепаратов. Ставрополь: 1997. –253 с.

Перечень дополнительной литературы:

1. Баснакян И.А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами.. М.: Медицина. –1992. –192 с.
2. Безбородов А.М. Биосинтез биологически активных веществ микроорганизмами. М.: Медицина. –1969. –246 с.
3. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. М.: Медицина. – 1973. – 456 с.
4. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. М.: Изд-во МГУ. -1989. –294 с.
5. Иванов В.Н. Энергетика роста микроорганизмов. Киев: Наукова думка. –1981. – 140 с.
6. Коротяев А.И. Механизмы саморегуляции бактериальной клетки. М.: Медицина. – 1973. –272 с.
7. Козлов Ю.А. Питательные среды в медицинской биологии. М.: МЕДГИЗ – 1950 – 252 с.
8. Месробяну Л., Пуэнеску Э. Физиология бактерий. Бухарест: Меридиане. –1963. – 807 с.
9. Мосичев М.С., Складнев А.А., Котов Б.В. Общая технология микробиологических производств. М.: Легкая и пищевая промышленность. –1982. – 264 с.
10. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир. – 1978. –331 с.
11. Практикум по физико-химическим методам в биологии. М.: Изд-во МГУ. –1981. –240 с.
12. Руководство по вакцинному и сывороточному делу. Под ред. Бургасова П.Н. М.: Медицина. –1978. –440 с.
13. Уэбб Ф. Биохимическая технология и микробиологический синтез. Пер. с англ. Швалева П.Е. М.: Медицина. –1969. –560 с.

Методическая литература:

1. Методические указания к лабораторным работам по дисциплине «Виды, использование и регенерация питательных сред».

Интернет-ресурсы:

1. <http://biblioclub.ru> : [ЭБС «Университетская библиотека ONLINE»];
2. <http://diss.rsl.ru> : [Электронная библиотека диссертаций РГБ];
3. <http://e.lanbook.com> : [ЭБС издательства «Лань»];
4. <http://elibrary.ru> : [Научная электронная библиотека eLIBRARY.RU];
5. <http://uisrussia.msu.ru> : [Университетская информационная система РОССИЯ (УИС РОССИЯ)].

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №7.

ТЕМА: КАЧЕСТВЕННОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД: БИУРЕТОВАЯ РЕАКЦИЯ; КСАПТОПРОТЕИНОВАЯ РЕАКЦИЯ; РЕАКЦИЯ НА СВОБОДНЫЙ ТРИПТОФАН.

Цель: освоение современных биотехнологических приемов приготовления и контроля качества питательных сред.

Формируемые компетенции:

ПК-1 – способность участвовать в разработке и проектировании технологических процессов согласно принятой в организации технологии производства пищевой и биотехнологической продукции с использованием современных систем автоматизированного проектирования.

ИД-1 ПК-1 Имеет представление о технологии производства и организации производственных и технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-2 ПК-1 Имеет представление об основе технологии производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-3 ПК-1 Может осуществлять входной и технологический контроль качества сырья, полуфабрикатов и готовой продукции для организации рационального ведения технологического процесса производства в целях разработки мероприятий по повышению эффективности производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-4 ПК-1 Использует методы проведения расчетов для проектирования производств биотехнологической продукции для пищевой промышленности, технологических линий, цехов, отдельных участков организаций с использованием систем автоматизированного проектирования и программного обеспечения, информационных технологий при создании проектов вновь строящихся и реконструкции действующих организаций.

ИД-5 ПК-1 Проводит основные технологические процессы производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-6 ПК-1 Осуществляет учет сырья и готовой продукции на базе стандартных и сертификационных испытаний производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности в целях обеспечения нормативов выхода готовой продукции в соответствии с технологическими инструкциями.

ИД-7 ПК-1 Учитывает показатели эффективности технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

Ход работы и фиксация результатов:

Качественное исследование питательных сред.

Биуретовая реакция: При добавлении 5 капель крепкой азотной кислоты к 10 мл профильтрованного прозрачного 1 % раствора пептона не должна образовываться муть, нерастворимая при нагревании до 100 °. К 1 мл 5% раствора пептона добавляют 2 мл 25% раствора едкого натра, смешивают, добавляют 3 капли 5% раствора медного купороса и взбалтывают; раствор дает красно-фиолетовую окраску.

При полном гидролизе белка наблюдают розовое окрашивание (пептоны) при наличии нерасщепленного белка - фиолетовое окрашивание. Биуретовая реакция присуща целой молекуле белка и продуктам его гидролиза (альбумозы, пептоны).

Результаты:

Ксаптонпротеиновая реакция. К 5 мл перевара или питательной среды добавляют 0,5-1 мл азотной кислоты, при этом обычно образуется осадок, который снова растворяется при нагревании (кипятят 2 минуты); жидкость и осадок окрашиваются в желтый цвет. После охлаждения добавляют немного аммиака или едкого натра; цвет раствора вместо желтого становится оранжевым. Реакция основана на содержании в белке бензольного ядра и указывает на присутствие в среде триптофана, тирозина или фенилаланина.

Результаты:

Реакция на свободный триптофан. Разводят исследуемый перевар 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, разливают по 5 мл в пробирки и добавляют в каждую из них несколько капель бромной воды; появление красного окрашивания свидетельствует о наличии триптофана.

Результаты:

Оборудование и материалы:

1. Выход в Интернет и университетскую сеть в лекционных, лабораторных, компьютерных аудиториях;
2. Мультимедийный проектор;
3. Ноутбук;
4. Текстовые и электронные ресурсы Научной библиотеки университета;
5. Наборы реактивов для проведения анализа образцов;
6. Бета-радиометр и нитратометр «SoEx»;
7. Исследуемые образцы питательных сред и их компонентов.

Указания по технике безопасности:

Правила по технике безопасности для работы в специализированной лаборатории (корпус «К», экспериментальный цех), оснащенной необходимыми приборами и оборудованием, а также на филиале кафедры, расположенном на молочном комбинате «Ставропольский», где имеется специализированная аудитория для лабораторных занятий.

Содержание отчета: При подготовке к лабораторным занятиям необходимо изучить лекционный материал, дополнительные источники литературы, рекомендованные преподавателем, а также самостоятельно подготовить ответы на вопросы к защите ЛАБОРАТОРНЫХ работ и выполнить задания по теме занятия.

Список литературы, рекомендуемый к использованию по данной теме:**Перечень основной литературы:**

1. Залашко М.В. Биотехнология переработки молочной сыворотки. М.: В.О. «Агропромиздат». – 1990. – 192 с.
2. Залашко М.В., Залашко Л.С. Микробный синтез на молочной сыворотке. Минск: Наука и техника. –1990. –274 с.
3. Сидоров М.С., Корнелаева Р.П. Микробиология мяса и мясопродуктов. М.: Колос. –1996. –240 с.
4. Тутов И.К., Ситьков В.И. Основы биотехнологии ветеринарных биопрепаратов. Ставрополь: 1997. –253 с.

Перечень дополнительной литературы:

1. Баснакьян И.А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами.. М.: Медицина. –1992. –192 с.
2. Безбородов А.М. Биосинтез биологически активных веществ микроорганизмами. М.: Медицина. –1969. –246 с.
3. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. М.: Медицина. – 1973. – 456 с.
4. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. М.: Изд-во МГУ. -1989. –294 с.
5. Иванов В.Н. Энергетика роста микроорганизмов. Киев: Наукова думка. –1981. – 140 с.
6. Коротяев А.И. Механизмы саморегуляции бактериальной клетки. М.: Медицина. – 1973. –272 с.
7. Козлов Ю.А. Питательные среды в медицинской биологии. М.: МЕДГИЗ – 1950 – 252 с.
8. Месробяну Л., Пуэнеску Э. Физиология бактерий. Бухарест: Меридиане. –1963. – 807 с.
9. Мосичев М.С., Складнев А.А., Котов Б.В. Общая технология микробиологических производств. М.: Легкая и пищевая промышленность. –1982. – 264 с.
10. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир. – 1978. –331 с.

11. Практикум по физико-химическим методам в биологии. М.: Изд-во МГУ. –1981. –240 с.
12. Руководство по вакцинному и сывороточному делу. Под ред. Бургасова П.Н. М.: Медицина. –1978. –440 с.
13. Уэбб Ф. Биохимическая технология и микробиологический синтез. Пер. с англ. Швалева П.Е. М.: Медицина. –1969. –560 с.

Методическая литература:

1. Методические указания к лабораторным работам по дисциплине «Виды, использование и регенерация питательных сред».

Интернет-ресурсы:

1. <http://biblioclub.ru> : [ЭБС «Университетская библиотека ONLINE»];
2. <http://diss.rsl.ru> : [Электронная библиотека диссертаций РГБ];
3. <http://e.lanbook.com> : [ЭБС издательства «Лань»];
4. <http://elibrary.ru> : [Научная электронная библиотека eLIBRARY.RU];
5. <http://uisrussia.msu.ru> : [Университетская информационная система РОССИЯ (УИС РОССИЯ)].

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №8.

ТЕМА: ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ ЧИСТОТЫ ПРОДАЖНОГО ПЕПТОНА.

Цель: освоение современных биотехнологических приемов приготовления и контроля качества питательных сред.

Формируемые компетенции:

ПК-1 – способность участвовать в разработке и проектировании технологических процессов согласно принятой в организации технологии производства пищевой и биотехнологической продукции с использованием современных систем автоматизированного проектирования.

ИД-1 ПК-1 Имеет представление о технологии производства и организации производственных и технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-2 ПК-1 Имеет представление об основе технологии производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-3 ПК-1 Может осуществлять входной и технологический контроль качества сырья, полуфабрикатов и готовой продукции для организации рационального ведения технологического процесса производства в целях разработки мероприятий по повышению эффективности производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-4 ПК-1 Использует методы проведения расчетов для проектирования производств биотехнологической продукции для пищевой промышленности, технологических линий, цехов, отдельных участков организаций с использованием систем автоматизированного проектирования и программного обеспечения, информационных технологий при создании проектов вновь строящихся и реконструкции действующих организаций.

ИД-5 ПК-1 Проводит основные технологические процессы производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-6 ПК-1 Осуществляет учет сырья и готовой продукции на базе стандартных и сертификационных испытаний производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности в целях обеспечения нормативов выхода готовой продукции в соответствии с технологическими инструкциями.

ИД-7 ПК-1 Учитывает показатели эффективности технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

Ход работы и фиксация результатов:

Определение степени чистоты продажного пептона.

Проблема химического контроля пептона сложна и в настоящее время не разрешена. Для определения чистоты продажного пептона 5-10 г пептона растворяют в 50 мл воды, подкисляют 2 каплями уксусной кислоты, прибавляют порошкообразный хлористый аммоний до насыщения (остается избыток нерастворимой соли), фильтруют и исследуют жидкость на истинные пептоны при помощи биуретовой реакции. Оставшийся на фильтре осадок промывают в насыщенном растворе хлористого аммония, дают стечь. Жидкость отжимают между листами фильтровальной бумаги и снова растворяют в нескольких мл воды. В этом растворе определяют отличительные признаки первичных и вторичных альбумоз.

Результаты:

Оборудование и материалы:

1. Выход в Интернет и университетскую сеть в лекционных, лабораторных, компьютерных аудиториях;
2. Мультимедийный проектор;
3. Ноутбук;
4. Текстовые и электронные ресурсы Научной библиотеки университета;
5. Наборы реактивов для проведения анализа образцов;
6. Бета-радиометр и нитратометр «SoEx»;
7. Исследуемые образцы питательных сред и их компонентов.

Указания по технике безопасности:

Правила по технике безопасности для работы в специализированной лаборатории (корпус «К», экспериментальный цех), оснащенной необходимыми приборами и оборудованием, а также на филиале кафедры, расположенном на молочном комбинате «Ставропольский», где имеется специализированная аудитория для лабораторных занятий.

Содержание отчета: При подготовке к лабораторным занятиям необходимо изучить лекционный материал, дополнительные источники литературы, рекомендованные преподавателем, а также самостоятельно подготовить ответы на вопросы к защите ЛАБОРАТОРНЫХ работ и выполнить задания по теме занятия.

Список литературы, рекомендуемый к использованию по данной теме:

Перечень основной литературы:

1. Залашко М.В. Биотехнология переработки молочной сыворотки. М.: В.О. «Агропромиздат». – 1990. – 192 с.
2. Залашко М.В., Залашко Л.С. Микробный синтез на молочной сыворотке. Минск: Наука и техника. –1990. –274 с.
3. Сидоров М.С., Корнелаева Р.П. Микробиология мяса и мясопродуктов. М.: Колос. –1996. –240 с.
4. Тутов И.К., Ситьков В.И. Основы биотехнологии ветеринарных биопрепаратов. Ставрополь: 1997. –253 с.

Перечень дополнительной литературы:

1. Баснакян И.А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами.. М.: Медицина. –1992. –192 с.
2. Безбородов А.М. Биосинтез биологически активных веществ микроорганизмами. М.: Медицина. –1969. –246 с.
3. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. М.: Медицина. – 1973. – 456 с.
4. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. М.: Изд-во МГУ. -1989. –294 с.
5. Иванов В.Н. Энергетика роста микроорганизмов. Киев: Наукова думка. –1981. – 140 с.
6. Коротяев А.И. Механизмы саморегуляции бактериальной клетки. М.: Медицина. – 1973. –272 с.
7. Козлов Ю.А. Питательные среды в медицинской биологии. М.: МЕДГИЗ – 1950 – 252 с.
8. Месробяну Л., Пуэнеску Э. Физиология бактерий. Бухарест: Меридиане. –1963. – 807 с.
9. Мосичев М.С., Складнев А.А., Котов Б.В. Общая технология микробиологических производств. М.: Легкая и пищевая промышленность. –1982. – 264 с.
10. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир. – 1978. –331 с.
11. Практикум по физико-химическим методам в биологии. М.: Изд-во МГУ. –1981. –240 с.
12. Руководство по вакцинному и сывороточному делу. Под ред. Бургасова П.Н. М.: Медицина. –1978. –440 с.
13. Уэбб Ф. Биохимическая технология и микробиологический синтез. Пер. с англ. Швалева П.Е. М.: Медицина. –1969. –560 с.

Методическая литература:

1. Методические указания к лабораторным работам по дисциплине «Виды, использование и регенерация питательных сред».

Интернет-ресурсы:

1. <http://biblioclub.ru> : [ЭБС «Университетская библиотека ONLINE»];
2. <http://diss.rsl.ru> : [Электронная библиотека диссертаций РГБ];
3. <http://e.lanbook.com> : [ЭБС издательства «Лань»];
4. <http://elibrary.ru> : [Научная электронная библиотека eLIBRARY.RU];
5. <http://uisrussia.msu.ru> : [Университетская информационная система РОССИЯ (УИС РОССИЯ)].

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №9.

ТЕМА: КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ПЕПТОНОВ.

Цель: освоение современных биотехнологических приемов приготовления и контроля качества питательных сред.

Формируемые компетенции:

ПК-1 – способность участвовать в разработке и проектировании технологических процессов согласно принятой в организации технологии производства пищевой и биотехнологической продукции с использованием современных систем автоматизированного проектирования.

ИД-1 ПК-1 Имеет представление о технологии производства и организации производственных и технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-2 ПК-1 Имеет представление об основе технологии производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-3 ПК-1 Может осуществлять входной и технологический контроль качества сырья, полуфабрикатов и готовой продукции для организации рационального ведения технологического процесса производства в целях разработки мероприятий по повышению эффективности производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-4 ПК-1 Использует методы проведения расчетов для проектирования производств биотехнологической продукции для пищевой промышленности, технологических линий, цехов, отдельных участков организаций с использованием систем автоматизированного проектирования и программного обеспечения, информационных технологий при создании проектов вновь строящихся и реконструкции действующих организаций.

ИД-5 ПК-1 Проводит основные технологические процессы производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-6 ПК-1 Осуществляет учет сырья и готовой продукции на базе стандартных и сертификационных испытаний производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности в целях обеспечения нормативов выхода готовой продукции в соответствии с технологическими инструкциями.

ИД-7 ПК-1 Учитывает показатели эффективности технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

Ход работы и фиксация результатов:

Колориметрический метод определения содержания пептонов. Предварительно готовят колориметрическую шкалу. Для этой цели 0,5 г пептона Витте растирают стеклянной палочкой в химическом стаканчике с 0,5 мл 30% раствора едкого натра и 2—3 мл дистиллированной воды, смывают дистиллированной водой, переводя смесь в мерную колбу, и доводят до 100 мл дистиллированной водой. Из приготовленного таким образом раствора готовят ряд стандартных пробирок по следующей схеме:

Ингредиенты	№ пробирки									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.5 % раствор пептона в мл	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0
Дистиллированная вода в мл	5,8	5,6	5,4	5,2	5,0	4,8	4,6	4,4	4,2	4,0
10 % раствор едкого натра в мл	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1 % раствор медного купороса в каплях	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Обозначение % пептона на стандартной пробирке	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0

Исследуемый перевар или питательный бульон предварительно разводят в 2—10 раз дистиллированной водой, в зависимости от содержания в нем пептона. Для определения в пробирку наливают 1 мл исследуемого перевара или питательного бульона, 1 мл 10% раствора едкого натра, 5 мл дистиллированной воды, 4 капли 1 % раствора медного купороса и сравнивают по цвету на белом фоне или в компараторе Уальполя с пробирками стандартного ряда.

Результаты:

Оборудование и материалы:

1. Выход в Интернет и университетскую сеть в лекционных, лабораторных, компьютерных аудиториях;

2. Мультимедийный проектор;
3. Ноутбук;
4. Текстовые и электронные ресурсы Научной библиотеки университета;
5. Наборы реактивов для проведения анализа образцов;
6. Бета-радиометр и нитратометр «SoEx»;
7. Исследуемые образцы питательных сред и их компонентов.

Указания по технике безопасности:

Правила по технике безопасности для работы в специализированной лаборатории (корпус «К», экспериментальный цех), оснащенной необходимыми приборами и оборудованием, а также на филиале кафедры, расположенном на молочном комбинате «Ставропольский», где имеется специализированная аудитория для лабораторных занятий.

Содержание отчета: При подготовке к лабораторным занятиям необходимо изучить лекционный материал, дополнительные источники литературы, рекомендованные преподавателем, а также самостоятельно подготовить ответы на вопросы к защите ЛАБОРАТОРНЫХ работ и выполнить задания по теме занятия.

Список литературы, рекомендуемый к использованию по данной теме:

Перечень основной литературы:

1. Залашко М.В. Биотехнология переработки молочной сыворотки. М.: В.О. «Агропромиздат». – 1990. – 192 с.
2. Залашко М.В., Залашко Л.С. Микробный синтез на молочной сыворотке. Минск: Наука и техника. –1990. –274 с.
3. Сидоров М.С., Корнелаева Р.П. Микробиология мяса и мясопродуктов. М.: Колос. –1996. –240 с.
4. Тутов И.К., Ситьков В.И. Основы биотехнологии ветеринарных биопрепаратов. Ставрополь: 1997. –253 с.

Перечень дополнительной литературы:

1. Баснакьян И.А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами.. М.: Медицина. –1992. –192 с.
2. Безбородов А.М. Биосинтез биологически активных веществ микроорганизмами. М.: Медицина. –1969. –246 с.
3. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. М.: Медицина. – 1973. – 456 с.
4. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. М.: Изд-во МГУ. -1989. –294 с.
5. Иванов В.Н. Энергетика роста микроорганизмов. Киев: Наукова думка. –1981. – 140 с.
6. Коротяев А.И. Механизмы саморегуляции бактериальной клетки. М.: Медицина. – 1973. –272 с.
7. Козлов Ю.А. Питательные среды в медицинской биологии. М.: МЕДГИЗ – 1950 – 252 с.
8. Месробяну Л., Пуэнеску Э. Физиология бактерий. Бухарест: Меридиане. –1963. – 807 с.
9. Мосичев М.С., Складнев А.А., Котов Б.В. Общая технология микробиологических производств. М.: Легкая и пищевая промышленность. –1982. – 264 с.
10. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир. – 1978. –331 с.
11. Практикум по физико-химическим методам в биологии. М.: Изд-во МГУ. –1981. –240 с.
12. Руководство по вакцинному и сывороточному делу. Под ред. Бургасова П.Н. М.: Медицина. –1978. –440 с.
13. Уэбб Ф. Биохимическая технология и микробиологический синтез. Пер. с англ. Швалева П.Е. М.: Медицина. –1969. –560 с.

Методическая литература:

1. Методические указания к лабораторным работам по дисциплине «Виды, использование и регенерация питательных сред».

Интернет-ресурсы:

1. <http://biblioclub.ru> : [ЭБС «Университетская библиотека ONLINE»];
2. <http://diss.rsl.ru> : [Электронная библиотека диссертаций РГБ];
3. <http://e.lanbook.com> : [ЭБС издательства «Лань»];
4. <http://elibrary.ru> : [Научная электронная библиотека eLIBRARY.RU];
5. <http://uisrussia.msu.ru> : [Университетская информационная система РОССИЯ (УИС РОССИЯ)].

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Методические указания

по выполнению практических занятий

по дисциплине «**Виды, использование и регенерация питательных сред**»

для студентов направления подготовки /специальности

19.03.01 - Биотехнология

Направленность (профиль) Промышленная биотехнология

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА №1.

Тема: *Значение питательных сред для народного хозяйства. Посевные и основные ферментационные производственные питательные среды.*

Цель: освоение современных биотехнологических приемов приготовления и контроля качества питательных сред.

Формируемые компетенции:

ПК-1 – способность участвовать в разработке и проектировании технологических процессов согласно принятой в организации технологии производства пищевой и биотехнологической продукции с использованием современных систем автоматизированного проектирования.

ИД-1 ПК-1 Имеет представление о технологии производства и организации производственных и технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-2 ПК-1 Имеет представление об основе технологии производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-3 ПК-1 Может осуществлять входной и технологический контроль качества сырья, полуфабрикатов и готовой продукции для организации рационального ведения технологического процесса производства в целях разработки мероприятий по повышению эффективности производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-4 ПК-1 Использует методы проведения расчетов для проектирования производств биотехнологической продукции для пищевой промышленности, технологических линий, цехов, отдельных участков организаций с использованием систем автоматизированного проектирования и программного обеспечения, информационных технологий при создании проектов вновь строящихся и реконструкции действующих организаций.

ИД-5 ПК-1 Проводит основные технологические процессы производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-6 ПК-1 Осуществляет учет сырья и готовой продукции на базе стандартных и сертификационных испытаний производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности в целях обеспечения нормативов выхода готовой продукции в соответствии с технологическими инструкциями.

ИД-7 ПК-1 Учитывает показатели эффективности технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

Контрольные вопросы:

1. Значение питательных сред для народного хозяйства.
2. Посевные и основные ферментационные производственные питательные среды.
3. Совершенствование и модификация технологии культивирования микроорганизмов с целью повышения урожая биомассы микробов или максимизации накопления целевого продукта.

Теоретическая часть.

В настоящее время проблема получения чистых культур микроорганизмов является актуальной для многих отраслей народного хозяйства: молочной, хлебопекарной, бродильной, винодельческой и др. Особые требования предъявляются к биотехнологии вакцинного производства, где в основном используются штаммы патогенных или условно патогенных микроорганизмов. При этом в случае нарушения технологии или изменения морфологических свойств исходных штаммов, возможно изменение иммуногенных свойств получаемых вакцин.

Очевидным является тот факт, что вне зависимости от сферы дальнейшего применения биопрепарата одним из основных условий получения ожидаемого результата является правильно подобранная питательная среда для культивирования микробов.

Так, питательная среда должна быть полноценной по компонентному составу и содержать все необходимые ингредиенты для интенсивного размножения популяции. Выращенные при этом микроорганизмы должны обладать заданными свойствами и во время дальнейшего использования не оказывать негативного воздействия на конечный результат их применения.

Со времен Пастера и до наших дней конструирование питательных сред было предметом научных исследований не одного поколения ученых из разных стран. Успешное приготовление биопрепарата, ростовые свойства входящих в его состав штаммов микроорганизмов, количество жизнеспособных клеток, так называемый

«урожай», или накопление продуктов жизнедеятельности (целевой продукт микробного синтеза) во многом определялся правильно подобранной средой жизнедеятельности культуры.

Производственные питательные среды в зависимости от их дальнейшего назначения делятся на посевные и основные ферментационные. Для их приготовления, как правило, используется дорогостоящее сырье животного и растительного происхождения. В этой связи исследования ряда авторов посвящены повышению экономической эффективности производства биопрепаратов. Так, определенные успехи достигнуты при частичной замене дорогостоящих ингредиентов более дешевыми. Заслуживают внимания работы по совершенствованию и модификации технологии культивирования микроорганизмов с целью повышения урожая биомассы микробов или максимизации накопления целевого продукта.

Несмотря на достигнутые успехи по совершенствованию процесса культивирования микроорганизмов глубинным методом используемая в качестве субстрата питательная среда после отделения клеток или продукта микробного синтеза сливается в канализацию в виде фугата или фильтрата, для инактивации которых, кроме того, требуются значительные (финансовые и энергетические) затраты.

Список литературы, рекомендуемый к использованию по данной теме:

Перечень основной литературы:

1. Залашко М.В. Биотехнология переработки молочной сыворотки. М.: В.О. «Агропромиздат». – 1990. – 192 с.
2. Залашко М.В., Залашко Л.С. Микробный синтез на молочной сыворотке. Минск: Наука и техника. –1990. –274 с.
3. Сидоров М.С., Корнелаева Р.П. Микробиология мяса и мясопродуктов. М.: Колос. –1996. –240 с.
4. Тутов И.К., Ситьков В.И. Основы биотехнологии ветеринарных биопрепаратов. Ставрополь: 1997. –253 с.

Перечень дополнительной литературы:

1. Баснакьян И.А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами.. М.: Медицина. –1992. –192 с.
2. Безбородов А.М. Биосинтез биологически активных веществ микроорганизмами. М.: Медицина. –1969. –246 с.
3. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. М.: Медицина. – 1973. – 456 с.
4. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. М.: Изд-во МГУ. -1989. –294 с.
5. Иванов В.Н. Энергетика роста микроорганизмов. Киев: Наукова думка. –1981. – 140 с.
6. Коротяев А.И. Механизмы саморегуляции бактериальной клетки. М.: Медицина. – 1973. –272 с.
7. Козлов Ю.А. Питательные среды в медицинской биологии. М.: МЕДГИЗ – 1950 – 252 с.
8. Месробяну Л., Пуэнеску Э. Физиология бактерий. Бухарест: Меридиане. –1963. – 807 с.
9. Мосичев М.С., Складнев А.А., Котов Б.В. Общая технология микробиологических производств. М.: Легкая и пищевая промышленность. –1982. – 264 с.
10. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир. – 1978. –331 с.
11. Практикум по физико-химическим методам в биологии. М.: Изд-во МГУ. –1981. –240 с.

12. Руководство по вакцинному и сывороточному делу. Под ред. Бургасова П.Н. М.: Медицина. –1978. –440 с.

13. Уэбб Ф. Биохимическая технология и микробиологический синтез. Пер. с англ. Швалева П.Е. М.: Медицина. –1969. –560 с.

Методическая литература:

1. Методические указания к лабораторным работам по дисциплине «Виды, использование и регенерация питательных сред».

Интернет-ресурсы:

1. <http://biblioclub.ru> : [ЭБС «Университетская библиотека ONLINE»];
2. <http://diss.rsl.ru> : [Электронная библиотека диссертаций РГБ];
3. <http://e.lanbook.com> : [ЭБС издательства «Лань»];
4. <http://elibrary.ru> : [Научная электронная библиотека eLIBRARY.RU];
5. <http://uisrussia.msu.ru> : [Университетская информационная система РОССИЯ (УИС РОССИЯ)].

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА №2.

Тема: *Роль ферментов в метаболизме микроорганизмов. Особенности процессов ферментолиза у микроорганизмов.*

Цель: освоение современных биотехнологических приемов приготовления и контроля качества питательных сред.

Формируемые компетенции:

ПК-1 – способность участвовать в разработке и проектировании технологических процессов согласно принятой в организации технологии производства пищевой и биотехнологической продукции с использованием современных систем автоматизированного проектирования.

ИД-1 ПК-1 Имеет представление о технологии производства и организации производственных и технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-2 ПК-1 Имеет представление об основе технологии производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-3 ПК-1 Может осуществлять входной и технологический контроль качества сырья, полуфабрикатов и готовой продукции для организации рационального ведения технологического процесса производства в целях разработки мероприятий по повышению эффективности производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-4 ПК-1 Использует методы проведения расчетов для проектирования производств биотехнологической продукции для пищевой промышленности, технологических линий, цехов, отдельных участков организаций с использованием систем автоматизированного проектирования и программного обеспечения, информационных технологий при создании проектов вновь строящихся и реконструкции действующих организаций.

ИД-5 ПК-1 Проводит основные технологические процессы производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-6 ПК-1 Осуществляет учет сырья и готовой продукции на базе стандартных и сертификационных испытаний производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности в целях обеспечения нормативов выхода готовой продукции в соответствии с технологическими инструкциями.

ИД-7 ПК-1 Учитывает показатели эффективности технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

Контрольные вопросы:

1. Проблема феномена стационарной фазы при культивировании питательных сред и варианты ее решения.
2. Применение биомембранных методов переработки сырья при направленном регулировании компонентного состава питательных сред.
3. Совершенствование технологических процессов культивирования микроорганизмов: применение биостимуляторов, гормональных препаратов, адаптация и модификация штаммов микроорганизмов, оптимизация технологических режимов и т.д.
4. Актуальность исследования продуктов культивирования питательных сред.

Теоретическая часть.

Из классической микробиологии известно, что в процессе культивирования бактерий при наступлении фазы замедленного роста или стационарной фазы количество сформировавшихся и отмерших клеток на первом этапе выравнивается. При дальнейшем культивировании процесс отмирания клеток превалирует над образованием новых. Часть исследователей данного феномена объясняют это явление истощением питательной среды. Другие авторы отдают предпочтение версии, согласно которой замедление роста клеток происходит из-за накопления в культуральной жидкости токсичных продуктов метаболизма, снижением уровня pH и изменением осмотического давления. По накоплению культуры в данной точке судят об урожае бакмассы. Этот показатель является скорее экономическим чем биологическим, так как затраты на приготовление питательной среды, ее стерилизации и сопровождение процесса культивирования за счет расходования пара, электроэнергии, сжатого стерильного воздуха и наличия высококвалифицированного персонала аппаратчиков и микробиологов довольно высоки.

Технология бактериальных препаратов, в особенности при производстве биопрепаратов на основе чистых культур микроорганизмов, предусматривает отделение

микробных клеток от питательного субстрата в начальный момент стационарной фазы, так как именно в данной точке общеизвестной кривой роста биотехнологические свойства бакконцентрата наиболее высоки и продолжение культивирования не имеет смысла. По всей видимости, к процессу отмирания клеток имеют отношение и чисто биологические факторы: возраст бактерий, образовавшихся на начальных стадиях культивирования.

Непрерывное культивирование, так называемый хемостат, при котором в отличие от периодического процесса к основной питательной среде в потоке добавляются свежий бульон или различные гидролизаты, содержащие необходимые лимитирующие компоненты. Однако, при производстве биопрепаратов, содержащих чистые культуры микроорганизмов, хемостат применяется редко.

В настоящее время в биотехнологии накоплен значительный опыт направленного регулирования компонентного состава и, следовательно, функциональных и биологических свойств сложных растворов, содержащих белки, углеводы, минеральные соли и т.д. При этом предпочтительным является применение биомембранных методов переработки сырья и создание тем самым безотходных технологий, позволяющих привлечь в производственную сферу дополнительные ресурсы биологически полноценных природных компонентов.

В доступной научной литературе последних лет большое внимание уделено совершенствованию технологических процессов культивирования микроорганизмов: применение биостимуляторов], гормональных препаратов ферментативных гидролизатов животного и микробного происхождения, использованию специально подобранных и адаптированных штаммов микроорганизмов, модификация существующих штаммов путем применения приемов генной инженерии, в частности клонирования, совершенствование аппаратного оформления, оптимизация технологических режимов, в том числе за счет применения средств автоматизации контроля и регулирования параметров, в особенности момента окончания экспоненциальной фазы, повышения уровня организации труда, оптимизации питательных сред путем математического планирования их состава и основных свойств.

Таким образом, с учетом приведенных данных, основное исследовательское поле находится в пределах фазы логарифмического роста бактерий и заканчивается с наступлением стационарной фазы. Дальнейшее направление исследовательской энергии было ориентировано непосредственно на продукт культивирования - культуру клеток микроорганизмов. Питательная среда, вернее та ее часть, которая не принимала участия в развитии популяции исследована крайне недостаточно, несмотря на ее довольно высокие биологические показатели и наличие ценных питательных веществ, в частности аминокислот. Доступная информация по данному вопросу носит обрывочный характер и не систематизирована. В отдельных работах показана возможность повторного использования вторичной питательной среды для выращивания бактерий других видов, так как продукты собственного метаболизма являются для них токсичными. Так, положительные результаты получены при использовании пермеата после отделения бакмассы *Bac. subtilis*. В эксперименте использовали культуру *L.lactis* для биосинтеза низина. На фоне вторичных продуктов различных биотехнологических производств пермеат культуральной жидкости позволил получить наибольшее накопление антибиотика, что свидетельствует о высоких остаточных ростовых свойствах этой сред.

Список литературы, рекомендуемый к использованию по данной теме:

Перечень основной литературы:

1. Залашко М.В. Биотехнология переработки молочной сыворотки. М.: В.О. «Агропромиздат». – 1990. – 192 с.
2. Залашко М.В., Залашко Л.С. Микробный синтез на молочной сыворотке. Минск: Наука и техника. –1990. –274 с.

3. Сидоров М.С., Корнелаева Р.П. Микробиология мяса и мясопродуктов. М.: Колос. –1996. –240 с.

4. Тутов И.К., Ситьков В.И. Основы биотехнологии ветеринарных биопрепаратов. Ставрополь: 1997. –253 с.

Перечень дополнительной литературы:

1. Баснакьян И.А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами.. М.: Медицина. –1992. –192 с.

2. Безбородов А.М. Биосинтез биологически активных веществ микроорганизмами. М.: Медицина. –1969. –246 с.

3. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. М.: Медицина. – 1973. – 456 с.

4. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. М.: Изд-во МГУ. -1989. –294 с.

5. Иванов В.Н. Энергетика роста микроорганизмов. Киев: Наукова думка. –1981. – 140 с.

6. Коротяев А.И. Механизмы саморегуляции бактериальной клетки. М.: Медицина. – 1973. –272 с.

7. Козлов Ю.А. Питательные среды в медицинской биологии. М.: МЕДГИЗ – 1950 – 252 с.

8. Месробяну Л., Пуэнеску Э. Физиология бактерий. Бухарест: Меридиане. –1963. – 807 с.

9. Мосичев М.С., Складнев А.А., Котов Б.В. Общая технология микробиологических производств. М.: Легкая и пищевая промышленность. –1982. – 264 с.

10. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир. – 1978. –331 с.

11. Практикум по физико-химическим методам в биологии. М.: Изд-во МГУ. –1981. –240 с.

12. Руководство по вакцинному и сывороточному делу. Под ред. Бургасова П.Н. М.: Медицина. –1978. –440 с.

13. Уэбб Ф. Биохимическая технология и микробиологический синтез. Пер. с англ. Швалева П.Е. М.: Медицина. –1969. –560 с.

Методическая литература:

1. Методические указания к лабораторным работам по дисциплине «Виды, использование и регенерация питательных сред».

Интернет-ресурсы:

1. <http://biblioclub.ru> : [ЭБС «Университетская библиотека ONLINE»];

2. <http://diss.rsl.ru> : [Электронная библиотека диссертаций РГБ];

3. <http://e.lanbook.com> : [ЭБС издательства «Лань»];

4. <http://elibrary.ru> : [Научная электронная библиотека eLIBRARY.RU];

5. <http://uisrussia.msu.ru> : [Университетская информационная система РОССИЯ (УИС РОССИЯ)].

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА №3.

Тема: *Влияние условий культивирования на питание и метаболизм микроорганизмов.*

Цель: освоение современных биотехнологических приемов приготовления и контроля качества питательных сред.

Формируемые компетенции:

ПК-1 – способность участвовать в разработке и проектировании технологических процессов согласно принятой в организации технологии производства пищевой и биотехнологической продукции с использованием современных систем автоматизированного проектирования.

ИД-1 ПК-1 Имеет представление о технологии производства и организации производственных и технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-2 ПК-1 Имеет представление об основе технологии производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-3 ПК-1 Может осуществлять входной и технологический контроль качества сырья, полуфабрикатов и готовой продукции для организации рационального ведения технологического процесса производства в целях разработки мероприятий по повышению эффективности производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-4 ПК-1 Использует методы проведения расчетов для проектирования производств биотехнологической продукции для пищевой промышленности, технологических линий, цехов, отдельных участков организаций с использованием систем автоматизированного проектирования и программного обеспечения, информационных технологий при создании проектов вновь строящихся и реконструкции действующих организаций.

ИД-5 ПК-1 Проводит основные технологические процессы производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-6 ПК-1 Осуществляет учет сырья и готовой продукции на базе стандартных и сертификационных испытаний производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности в целях обеспечения нормативов выхода готовой продукции в соответствии с технологическими инструкциями.

ИД-7 ПК-1 Учитывает показатели эффективности технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

Контрольные вопросы:

1. Питание. Роль ферментов в метаболизме микроорганизмов.
2. Действие гидролитической ферментативной системы в процессе переваривания пищи.
3. Проникновение низкомолекулярных соединений через клеточную мембрану в протоплазму клетки.
4. Особенности процессов ферментализации у микроорганизмов.

Теоретическая часть.

Пищей принято называть любое вещество, которое, попав в живой организм, служит эффективным источником энергии или пластическим материалом для роста организма. Микроорганизмы лишены специализированных органов пищеварения, дыхания и выделения. Все эти функции выполняют ферменты, благодаря которым питательные вещества поступают в клетку, подвергаются внутриклеточным превращениям в энергоёмкие и структурные соединения. Эти процессы являются сопряженными и взаимосвязанными, отражают разные стороны обмена веществ, поэтому весь процесс утилизации микробами питательных веществ именуется метаболизмом от английского **metabolism** - обмен веществ. Следует отметить, что в настоящее время большинство авторов под данным термином подразумевают жизнедеятельность организма как таковую, в том числе динамику и кинетику обменных процессов

Процесс переваривания пищи у животных начинается в ротовой полости под действием гидролитической ферментной системы и по мере продвижения по пищеварительному тракту сложные пищевые системы расщепляются на более простые растворимые соединения, такие как аминокислоты, жирные кислоты и моносахара, в основном - глюкоза. В отличие от исходной пищи, имеющей преимущественно плотную структуру, эти низкомолекулярные соединения с незначительными геометрическими размерами могут проникать через клеточную оболочку или мембрану вакуоли в

протоплазму клетки. При этом по мере перемещения пищи по желудочно-кишечному тракту, ферментные системы организма сменяют друг друга по мере расщепления или ферментализации исходного пищевого комплекса.

У микроорганизмов процесс ферментализации имеет свои характерные отличия. Микробная клетка в связи с отсутствием специфических органов пищеварения способна в зависимости от условий ее нахождения выделять в окружающую среду ферменты, необходимые для расщепления доступных питательных веществ до удобоваримого состояния. То есть, предварительный процесс пищеварения начинается за пределами клетки.

Если контакт пищеварительных ферментов с субстратом произошел, начинается процесс переваривания пищи с образованием мелких молекул простых растворимых веществ. В дальнейшем процесс усвоения низкомолекулярных соединений клеткой аналогичен описанному выше, что подтверждает положение о единстве биологических процессов в живой природе.

Микробная клетка окружена оболочкой или мембраной, представляющей собой высокоорганизованную структуру, обеспечивающую поступление внутрь питательных веществ и выводящую наружу ненужные продукты обмена, гидролитические ферменты и другие вещества, образованные клеткой в процессе ее жизнедеятельности. Для осуществления столь многообразных функций клеточная оболочка должна обладать тонко дифференцированной избирательной проницаемостью или селективностью для низко- и высокомолекулярных соединений, необходимых клетке. Растворенные или диспергированные в водной фазе частицы вещества находятся в непрерывном хаотическом движении, которое при отсутствии электрического или центробежного полей известно как броуновское. Движущей силой, определяющей или регламентирующей поступление частиц к клетке является концентрационная поляризация, определяемая рядом факторов, наиболее значимыми из которых являются величина заряда на ее поверхности, концентрация и степень ионизации вещества. При этом фактору концентрации согласно теории броуновского движения, еще в 1905 году описанной Энштейном, отводится практически утилитарная роль: чем выше концентрация, тем выше вероятность контакта частицы и бактерии. С временной точки зрения следует отметить и подвижность частиц, которая находится в линейной зависимости от величины их молекулярного веса. Однако, в большей степени вероятности это утверждение справедливо для неорганических компонентов системы. Протеиновые, липидные и липопротеиновые составляющие, имеющие, кроме того, достаточно разветвленную пространственную структуру, обладают подвижностью на несколько порядков ниже, чем простые низкомолекулярные соединения.

Согласно логике приведенных рассуждений следует, что в первую очередь подвержены диффузии через мембранную оболочку микробной клетки низкомолекулярные фрагменты окружающей среды. Однако в действительности, диффузионные процессы на границе раздела содержимого клетки и среды имеют логарифмическую зависимость и не являются функцией молекулярного веса и геометрических размеров.

Столь же важной функцией мембраны являются ее чисто механические свойства - она подобно футляру удерживает в замкнутом объеме содержимое клетки и поддерживает в заданных пределах величину осмотического давления. О механической прочности оболочки свидетельствует тот факт, что она способна поддерживать жизнеспособную клетку в состоянии тургора. В этом случае величина избыточного давления по отношению к окружающей среде составляет 3 атм. и более. Отдельные представители выдерживают давление до 25 атм.

На метаболизм микроорганизмов и их фенотипические признаки оказывает влияние целый ряд физических и биологических факторов: наличие воды, температура, активная кислотность, окислительно-восстановительный потенциал, осмотическое

давление, содержание энергетических, ростовых, структурообразующих веществ, их соотношение и ряд других, не менее важных по значимости соединений.

В этой связи при конструировании искусственной питательной среды необходимо учитывать физиологические особенности культивируемых штаммов микроорганизмов и конечную цель процесса. Не менее важную роль при этом играют химический состав, биологические свойства и качественные показатели основного сырья и ингредиентов. При использовании гидролизатов необходимо неукоснительно соблюдать технологию их приготовления с тем, чтобы свести до минимума расхождения глубины и степени гидролиза, так как стабильно высокое накопление бакмассы возможно получать лишь при наличии стандартной по компонентному составу и ростовым свойствам питательной основы.

Список литературы, рекомендуемый к использованию по данной теме:

Перечень основной литературы:

1. Залашко М.В. Биотехнология переработки молочной сыворотки. М.: В.О. «Агропромиздат». – 1990. – 192 с.
2. Залашко М.В., Залашко Л.С. Микробный синтез на молочной сыворотке. Минск: Наука и техника. –1990. –274 с.
3. Сидоров М.С., Корнелаева Р.П. Микробиология мяса и мясопродуктов. М.: Колос. –1996. –240 с.
4. Тутов И.К., Ситьков В.И. Основы биотехнологии ветеринарных биопрепаратов. Ставрополь: 1997. –253 с.

Перечень дополнительной литературы:

1. Баснакян И.А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами.. М.: Медицина. –1992. –192 с.
2. Безбородов А.М. Биосинтез биологически активных веществ микроорганизмами. М.: Медицина. –1969. –246 с.
3. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. М.: Медицина. – 1973. – 456 с.
4. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. М.: Изд-во МГУ. -1989. –294 с.
5. Иванов В.Н. Энергетика роста микроорганизмов. Киев: Наукова думка. –1981. – 140 с.
6. Коротяев А.И. Механизмы саморегуляции бактериальной клетки. М.: Медицина. – 1973. –272 с.
7. Козлов Ю.А. Питательные среды в медицинской биологии. М.: МЕДГИЗ – 1950 – 252 с.
8. Месробяну Л., Пуэнеску Э. Физиология бактерий. Бухарест: Меридиане. –1963. – 807 с.
9. Мосичев М.С., Складнев А.А., Котов Б.В. Общая технология микробиологических производств. М.: Легкая и пищевая промышленность. –1982. – 264 с.
10. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир. – 1978. –331 с.
11. Практикум по физико-химическим методам в биологии. М.: Изд-во МГУ. –1981. –240 с.
12. Руководство по вакцинному и сывороточному делу. Под ред. Бургасова П.Н. М.: Медицина. –1978. –440 с.
13. Уэбб Ф. Биохимическая технология и микробиологический синтез. Пер. с англ. Швалева П.Е. М.: Медицина. –1969. –560 с.

Методическая литература:

1. Методические указания к лабораторным работам по дисциплине «Виды, использование и регенерация питательных сред».

Интернет-ресурсы:

1. <http://biblioclub.ru> : [ЭБС «Университетская библиотека ONLINE»];
2. <http://diss.rsl.ru> : [Электронная библиотека диссертаций РГБ];
3. <http://e.lanbook.com> : [ЭБС издательства «Лань»];
4. <http://elibrary.ru> : [Научная электронная библиотека eLIBRARY.RU];
5. <http://uisrussia.msu.ru> : [Университетская информационная система РОССИЯ (УИС РОССИЯ)].

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА №4.

Тема: *Влияние физических и биологических факторов на метаболизм микроорганизмов.*

Цель: освоение современных биотехнологических приемов приготовления и контроля качества питательных сред.

Формируемые компетенции:

ПК-1 – способность участвовать в разработке и проектировании технологических процессов согласно принятой в организации технологии производства пищевой и биотехнологической продукции с использованием современных систем автоматизированного проектирования.

ИД-1 ПК-1 Имеет представление о технологии производства и организации производственных и технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-2 ПК-1 Имеет представление об основе технологии производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-3 ПК-1 Может осуществлять входной и технологический контроль качества сырья, полуфабрикатов и готовой продукции для организации рационального ведения технологического процесса производства в целях разработки мероприятий по повышению эффективности производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-4 ПК-1 Использует методы проведения расчетов для проектирования производств биотехнологической продукции для пищевой промышленности, технологических линий, цехов, отдельных участков организаций с использованием систем автоматизированного проектирования и программного обеспечения, информационных технологий при создании проектов вновь строящихся и реконструкции действующих организаций.

ИД-5 ПК-1 Проводит основные технологические процессы производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-6 ПК-1 Осуществляет учет сырья и готовой продукции на базе стандартных и сертификационных испытаний производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности в целях обеспечения нормативов выхода готовой продукции в соответствии с технологическими инструкциями.

ИД-7 ПК-1 Учитывает показатели эффективности технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

Контрольные вопросы:

1. Влияние физических и биологических факторов на метаболизм микроорганизмов.
2. Значение воды и особенности ее использования в микробиологическом синтезе.
3. Влияние температуры на ход микробиологического синтеза.
4. Пастеризация и стерилизация.
5. Активная кислотность (pH) и окислительно-восстановительный потенциал (Eh).
6. Минеральные вещества и осмотическое давление.
7. Энергетические и ростовые вещества питательной среды.
8. Факторы роста и биостимуляторы.

Теоретическая часть.

Вода. Как отмечалось выше, подавляющее большинство бактерий потребляют пищу в растворенном виде. Вода, как универсальный растворитель, служит основой для всех биологических процессов. Кроме того, все живые организмы, включая микроорганизмы на 85-90% состоят из воды, которая находится в свободном и связанном состоянии. В гидролитических реакциях при участии воды происходят реакции расщепления липидов, белков и их производных, углеводов, протекают реакции гидратации и дегидратации, окислительно-восстановительные процессы. Микробная клетка окружена коллоидной гидратированной оболочкой, которая за счет сил электростатического взаимодействия поляризует молекулы воды и растворенных в ней компонентов питательной среды. Последние в свою очередь диссоциируются и за счет сил электролитического взаимодействия притягиваются к разнородно заряженным активным участкам клетки, после чего вступают в действие трансферазы и фосфолипиды, ответственные за доставку питательных компонентов в клетку.

При снижении содержания свободной влаги биологические процессы у вегетативных форм многих видов микроорганизмов замедляются, а при высушивании практически полностью прекращаются, так как они в значительной степени определяются

осмосом, диффузией, ионизацией и размерами коллоидных частиц, что в свою очередь зависит от степени гидратации. В данном аспекте целесообразно упомянуть термин «активность воды», которая напрямую связана с наличием в системе свободной влаги. Причем, большинство авторов отмечают, что чем выше влажность окружающей среды, тем активнее динамика всех биологических обменных процессов. По этой причине биотехнология выращивания чистых культур в производстве бактериальных препаратов при наличии прочих условий осуществляется преимущественно в жидких питательных средах.

При высушивании показатель активности воды снижается, что вызывает полную остановку вегетативных процессов в бактериальной клетке. Так, сухие пищевые продукты, даже при высокой бактериальной обсемененности, способны сохранять свой качественные показатели в течение длительного времени. При увлажнении продукта большинство микроорганизмов способно прорасти и вызвать биологическую порчу. Свойство микробов сохранять жизнеспособность при высушивании, использовано в технологии биопрепаратов, где чистые культуры микроорганизмов в виде сырой бакмассы расфасовываются во флаконы из нейтрального стекла, высушиваются лиофильным способом в условиях высокого вакуума и герметически упаковываются. Имеются данные, что высушенные подобным образом патогенные стрептококки сохранялись в течение 25 лет. При заполнении флаконов с высушенной культурой инертными газами, в частности азотом, гарантированный срок хранения препарата существенно увеличивается.

Температура. Микроорганизмы способны сохраняться в достаточно широком диапазоне температур: от льдов Антарктиды до кратеров вулканов. Основная роль в их терморезистентности отводится липидам, хотя с биологической точки зрения способность развиваться при высоких температурах является биохимической аномалией, так как температурный максимум для нативных белков, являющихся основой всего живого, не превышает 50-60°C, хотя при увеличении экспозиции температурный градиент термостойкости смещается в область более низких значений. Для подавляющего большинства патогенных микробов температурный оптимум развития соответствует температуре тела своего носителя, для человека и теплокровных животных - 36-37°C. При этой же температуре ведется культивирование микроорганизмов, используемых в производстве вакцин. Имеются сведения, что отклонения в меньшую или более высокую от оптимальной температуры область значений может вызвать накопление в культуральной жидкости неспецифических белков, способных вызывать аллергические реакции при вакцинировании животных и людей. Кроме того, снижение температуры существенно удлиняет продолжительность культивирования и вызывает лизис клеток, образовавшихся на начальных стадиях процесса. В производстве так называемых «живых» вакцин и биопрепаратов этот фактор является обесценивающим по отношению к конечному продукту.

В ряде случаев, в зависимости от конечной цели, температуру культивирования меняют в пользу оптимизации температуры ферментных эндо - и экзосистем, способствующих синтезу целевого продукта: антибиотиков, ферментов и других сложных органических соединений.

В пищевой биотехнологии, в частности при производстве молочных продуктов, используется сочетание мезофильной и термофильной молочнокислой микрофлоры. В соответствии с технологическим регламентом производства конкретного продукта и видом используемых штаммов температуру в ходе процесса меняют для последовательной активизации жизнедеятельности всей комбинации входящих в состав сложной заквасочной культуры молочнокислых микроорганизмов. При производстве сычужных сыров температуру свертывания устанавливают в пределах 30-32°C, во время обработки сырного зерна проводят второе нагревание при 37°C, а в ряде случаев при 42°C, что благоприятно сказывается на кислотообразующей и ферментативной активности микрофлоры.

Низкая (плюсовая) и отрицательная температуры менее пагубно сказываются на жизнеспособности микробных клеток, в связи с чем рекомендовано коллекционные штаммы микроорганизмов хранить в консервирующих средах в холодильниках.

При высоких температурах, превышающих оптимальные, жизненные функции бактериальных клеток резко замедляются и ослабевают в связи со снижением ферментативной активности и нарушением осмотических процессов. При дальнейшем повышении температуры происходят необратимые изменения, обусловленные денатурацией белков цитоплазмы, инактивацией ферментов, в результате чего микроорганизмы теряют жизнеспособность. Термоустойчивость микроорганизмов в значительной степени зависит от особенностей среды, в которых они находятся в момент нагревания. Во влажной среде микроорганизмы отмирают быстрее, чем в сухом нагретом воздухе, так как скорость денатурации белков прямо пропорциональна содержанию влаги в среде. Аналогичным образом термостойкость белков зависит от кислотности.

Губительное действие высоких температур используется для уничтожения микроорганизмов. При этом эффективность процесса является функцией температуры и времени. Существует два основных вида тепловой обработки: пастеризация и стерилизация, широко применяемые в биотехнологии пищевых продуктов, биопрепаратов, ветеринарии, медицине и так далее.

Пастеризация – это нагревание продукта от 63°C до 90°C. Продолжительность экспозиции в зависимости от вида продукта, объема, используемой тары и температуры от нескольких секунд до 30 минут. При этом погибают не все микроорганизмы: споры большинства бацилл и клостридий, некоторые термостойкие бактерии сохраняют жизнеспособность.

Стерилизация – это нагревание продукта от 100°C до 120°C с выдержкой 20-40 минут и проводится для обеспложивания объекта. Применяется при производстве мясных, молочных и растительных консервов, а также для стерилизации посуды, инструмента, питательных сред в микробиологической промышленности, ветеринарии и медицине. При этом процесс ведется в автоклавах под избыточным давлением. В ряде случаев стерилизация проводится в сухожаровых шкафах при температурах от 180°C и выше.

Активная кислотность (рН) и окислительно-восстановительный потенциал (Еh). Активная кислотность - это обратные значения отрицательного логарифма концентрации ионов водорода в г/л и определяется степенью диссоциации находящихся в растворе кислот и их содержанием. Значения окислительно-восстановительного потенциала и рН обычно используют для характеристики окислительных и иных свойств среды, клетки, ее компонентов и отдельных химических веществ. Показатель Еh служит мерой способности биологической системы отдавать или принимать электроны. Этот потенциал отсчитывается относительно потенциала молекулярного водорода. Водородный электрод (платиновая пластинка, погруженная в раствор кислоты и обтекаемая током водорода) при рН=0 и атмосферном давлении имеет потенциал, равный нулю. При рН=7,0 водородный электрод имеет потенциал (Е_o) = -420 мВ.

С повышением температуры раствора подвижность ионов усиливается, что в свою очередь увеличивает диссоциацию и, соответственно, приводит к сдвигу активной кислотности в область более низких значений. Большинство бактерий наиболее активно развиваются в средах с нейтральными или весьма близкими к нейтральным значениями рН. Некоторые микроорганизмы «предпочитают» нейтральную реакцию среды, но при этом хорошо переносят область кислых значений (рН - 4,0 и ниже).

По всей видимости, область нейтральных значений активной кислотности является оптимальной не столько для микроорганизмов, сколько для продуцируемых ими эндо- и экзоферментов. Эти сложные соединения играют важную роль в биосинтезе. По этой причине их называют биокатализаторами. В настоящее время выделен и изучен широкий спектр ферментов. Важной их особенностью является наличие в составе каждого фермента какого-либо витамина, роль которых в биологическом синтезе общеизвестна. Являясь, по сути, белковыми комплексами, ферменты весьма чувствительны к

изменениям pH и при отклонении от оптимума в кислую или щелочную сторону теряют свою активность. В простых растворах оптимум активной кислотности ферментов несколько шире. Тем не менее, он напрямую зависит от солевого состава и концентрации раствора, температуры, количества субстрата и так далее. В сложных растворах, к которым относятся и питательные среды, границы действия ферментов по показателю pH значительно сужаются. При отклонении от оптимума ферменты теряют свою активность и, как следствие, способность участвовать в метаболических процессах клетки. В этой связи во время культивирования бактерий необходимо pH культуральной жидкости поддерживать на строго определенном, оптимальном для жизнедеятельности, уровне, безусловно, если это не противоречит интересам синтеза целевого продукта.

Для направленного регулирования технологических параметров микробиологического синтеза, в том числе и pH, многие авторы используют термин «управляемое культивирование». Как отмечалось, оптимум значений активной кислотности для большинства видов микробов находится в строго заданной области. В производстве чистых культур это особенно актуально, так как доказано, что, например, при культивировании *Pasteurella multocida* прослеживается строгая корреляция между значениями оптической плотности культуральной жидкости и pH. Полученные данные позволили авторам создать математическую модель и вывести критериальные уравнения зависимости количественного прироста числа жизнеспособных клеток от величины значений активной кислотности.

Наиболее доступным и широко применяемым способом стабилизации pH является добавление разбавленных до 0,1 н растворов кислот или щелочей. При этом отмечено, что при попытке изменения активной кислотности в ту или иную сторону происходит запаздывание изменения абсолютного показателя pH от дозы добавленного реагента. В особенности это характерно для питательных сред приготовленных на основе мясного бульона. Иными словами, титрование показывает, что даже в области значений pH близких к нейтральным, бульон имеет тенденцию к противодействию изменения реакции среды. Данное явление обусловлено буферными свойствами некоторых компонентов бульона, в особенности белковыми составляющими: аминокислотами, полипептидами и протеазами. Эти соединения, не являясь ни сильными кислотами, ни сильными щелочами, тем не менее, способны соединяться как с кислотами, так и со щелочами. Эту особенность белков и продуктов их ферментолитического расщепления сдерживать снижение pH при культивировании микроорганизмов в практическом применении рекомендовано усиливать добавлением буферных солей. Чаще всего для этих целей используются водные растворы смесей одно- и двухзамещенных фосфатов калия (KH_2PO_4 или K_2HPO_4). В водных растворах фосфаты диссоциируют относительно слабо, то есть не дают ни резко кислой, ни резко щелочной реакции. При связывании кислоты в культуральной жидкости двуосновная соль присоединяет атомарный водород с образованием одноосновной соли. В случае необходимости связывания щелочи водород одноосновной соли связывается с OH^- - группой с образованием воды, а оставшаяся часть фосфата соединяется с катионом щелочи. Определенными буферными свойствами также обладают карбонаты и бикарбонаты, что послужило причиной их широкого использования в составе сложных питательных сред.

Корректировку pH в ряде случаев рекомендуется производить путем постоянного дозирования раствора глюкозы, роль которой помимо всего - обеспечение энергетических потребностей микроорганизмов при культивировании.

Изменение значения pH, как правило, приводит к сдвигу окислительно-восстановительного потенциала в ту или иную сторону. Установлено, что изменение внутриклеточной величины pH вызывает изменение Eh и в среде. Причем, во время лаг-фазы развития аэробной микробной культуры Eh снижается до определенных значений, затем наступает перелом и, начиная с нижней экстремальной точки, начинается фаза экспоненциального роста. Преждевременное повышение значений Eh является свидетельством неблагоприятного развития процесса под воздействием какого-либо

внешнего фактора. При чрезмерно высоких значениях E_h среды часть полезной энергии нерационально тратится на снижение этого показателя, что в свою очередь снижает энергию роста аэробной культуры.

Таким образом, отклонения pH и E_h от оптимальных (но не летальных) значений приводит к тому, что популяция микроорганизмов начинает не столько развиваться, сколько бороться за выживание в условиях неспецифического стресса при резко возрастающих энергетических затратах на поддержание клеточной структуры. При этом отмечается, что изменяется не только химический состав бактериальной клетки, но и ее морфология. Смещение показателей активной кислотности и окислительно-восстановительного потенциала вызывает адекватную защитную реакцию клетки, обусловленную ее природой, с довольно высокой скоростью. Дрожжи семейства *S. utilis* при снижении pH от 4,5 до 2,5 в течение трех минут в 17 раз повышали содержание так называемого стрессового АТФ. Нормализация активной кислотности приводила к реверсу содержания АТФ, но уже в течение 5-7 минут. Аналогичным образом срабатывают защитные механизмы и у ряда других культур, причем не только при изменении pH и E_h , но и других параметров среды. На практике путем изменения электрофизических и других параметров и включения различные биологических механизмов провоцируют синтез конкретных целевых продуктов.

Минеральные вещества и осмотическое давление. Растворы, используемые в микробиологическом синтезе в зависимости от концентрации растворенных солей условно подразделяются на гипотонические и гипертонические. В наиболее общем случае перемещение веществ через мембрану из одной части системы в другую вызывается двумя основными причинами: повышением гидростатического давления в одной из частей системы и увеличением в другой ее части концентрации растворенного вещества, для которого мембрана менее проницаема, чем для воды. Второй случай известен как осмос, при котором мембрана проницаема как для вещества, так и для растворителя. Подобное взаимодействие между стационарными потоками вполне удовлетворительно вписывается в законы термодинамики, которые предполагают, что каждый из обобщенных потоков пропорционален всем обобщенным силам, действующим в системе. То есть, чем выше разность концентраций ингредиентов по обе стороны мембраны, тем интенсивнее динамика обменных процессов. Так, в микробной клетке, помещенной в дистиллированную воду, происходят интенсивные обменные диффузионные процессы на границе раздела клетка/среда солей в окружающую среду и воды внутрь микроорганизма. Этот процесс, согласно закону равновесия движущих сил в системе, будет происходить до момента достижения одинаковой концентрации всех компонентов. Вполне естественно, что в таких условиях клетка вскоре погибнет за счет механического разрушения оболочки из-за избыточного давления. При равенстве концентраций солей система клетка/среда находится в стационарном состоянии, что обусловлено постоянством свойств мембраны и концентрации ионов вблизи ее поверхности. В случае увеличения концентрации солей и, следовательно, повышения осмотического давления водной фазы, свободная влага диффундирует в окружающую среду, клетка обезвоживается и также погибает в результате так называемого «осмотического шока». Это явление зачастую используется в биотехнологии для выделения из клетки ферментов, специфических, так называемых стрессовых, белков или липидов. Оптимальными являются так называемые физиологические растворы, в которых концентрация растворенных солей строго дозирована. Наиболее простым и доступным для применения является водный раствор $NaCl$, который в стерильном виде используется для растворения сухих вакцин перед их применением по назначению. При конструировании синтетических питательных сред чаще всего используются сложные комплексы солей, в том числе микроэлементы, которые помимо буферных свойств являются важной составной частью жизненно необходимых ферментов, участвуют в синтезе РНК и ДНК, выполняют структурообразующие функции при формировании новых клеток. Так, наиболее широко применяются, кроме указанных выше буферных солей, $NaCl$, $CaCl_2$, $FeSO_4$, Na_2MoO_4 ,

MgSO₄, (NH₄)₂SO₄. Вполне естественно, что перечисленные соли служат важным фактором регулирования и поддержания в заданных пределах осмотического давления среды. Из микроэлементов чаще всего используются Fe, Mn, Zn, Co и другие.

Следует отметить, что микроорганизмы весьма требовательны к качеству ингредиентов, используемых для приготовления питательных сред. Так, с целью исключения влияния случайных факторов в виде минеральных солей, содержащихся в питьевой воде, используемой для приготовления питательных сред, необходимо проведение ее деминерализации или деионизации. Причем, максимальный эффект достигается при 2-3-кратной дистилляции. Для снижения энергозатрат на практике одну дистилляцию заменяют пропусканием воды через ионообменную колонку. Степень очистки воды от солей определяется путем измерения ее электропроводности. Считается, что вода, имеющая сопротивление порядка 1,5-2,0 МОм пригодна для использования в качестве основы питательной среды. Остаточная электропроводность объясняется растворением атмосферной углекислоты. Аналогичные требования предъявляются к таре, используемой для хранения воды. Кроме того, даже в случае использования специальной, химически инертной, тары, срок хранения деминерализованной воды в ней должен быть ограниченным несколькими часами. Химические реактивы также должны иметь наивысшую степень чистоты, так как в ряде случаев даже незначительное количество не идентифицированных примесей может быть токсичным для клетки и вызывать замедление ее роста.

Анализ доступной научной литературы и нормативно-технической документации по вопросам конструирования и приготовления питательных сред для культивирования различных групп микроорганизмов показывает, что большинство авторов предусматривает весьма регламентированную дозировку минеральной составляющей без учета вариабельности используемого, в частности - белкового, сырья. Последнее, как известно, зачастую содержит довольно богатый и разнообразный набор минеральных веществ, количественно изменяющихся в зависимости от вида, пола и породы животного, его возраста, условий и рациона кормления, физического состояния перед убоем, сезонности и целого ряда факторов. Аналогичным образом изменяются физико-химические показатели и, соответственно, биологические свойства молочно-белковых, рыбных, растительных и других компонентов, используемых для приготовления сред.

Практикуемые до настоящего времени подходы к процессу конструирования питательных сред на наш взгляд является поверхностным, а в ряде случаев ошибочным, так как не учитывает физико-химических и биологических свойств используемого сырья и реальных потребностей микробов. По всей видимости, добавление минеральных веществ и буферных солей должно быть строго дозированным и осуществляться в конце процесса приготовления сред после проведения анализов по определению, как минимум величины осмотического давления, хотя этого, безусловно, явно недостаточно.

Энергетические и ростовые вещества питательной среды, как отмечалось выше, создают предпосылки и условия для метаболических процессов при культивировании микроорганизмов. Установлено, что из энергетических веществ наиболее предпочтительной является легкоусвояемая глюкоза, которая, являясь моносахаром, легче атакуется ферментами и не требует существенных затрат для утилизации. Под воздействием ферментов гексокиназы и глюкокиназы глюкоза, преимущественно ее D-форма, превращается множество соединений, наиболее важным из которых является глюкозо-6-фосфат, а углекислый газ выводится из клетки за ее пределы. При этом используется большая энергия фосфатной связи адезинтрифосфата (АТФ).

Углеводы с более сложной структурой, в частности лактоза, проходят стадию предварительной ферментации и расщепляются на простые сахара глюкозу и галактопиранозу. То есть, во втором случае, процесс идет в два этапа: расщепление гликозидной связи под воздействием фермента лактазы и непосредственно атака моносахаров микробными экзоферментами. По способности ферментировать углеводы штаммы микроорганизмов, используемые в вакцинном производстве, существенно

уступают культурам, применяемым в других областях биотехнологического производства. Так, например пастереллы и сальмонеллы активно потребляют арабинозу, глюкозу, галактозу, мальтозу, маннит. Сложные (многоатомные) сахара ввиду отсутствия у данных культур специфических ферментов им не доступны. Способность бактерий потреблять углеводы позволяет осуществлять их видовую идентификацию. Так, например для бифидобактерий предпочтительным углеводом является именно лактоза, являющаяся для данных микробов специфическим сахаром.

В зависимости от вида культивируемого микроорганизма меняется дозировка, так называемая подкормка, углеводов. Для большинства культур максимальной одновременной дозой является 8-10%. Повышение дозировки в ряде случаев позволяет ускорить деление клеток и увеличить накопление биомассы, но это чревато изменением морфологии получаемых культур за счет того, что клетка не успевает сформироваться как полноценный биологический организм. Кроме того, одномоментная передозировка углеводов, может вызвать лимитирование других питательных веществ и снижение скорости накопления биомассы. По всей видимости, этот вывод можно распространить на большинство производственных культур микроорганизмов. В промышленных условиях, во избежание повышения осмотического давления и возникновения фактора лимитирования, подкормку ведут малыми дозами с интервалом 3-4 часа. Второй причиной дробного дозирования углеводов является их способность при высоких температурах вызывать реакцию меланоидинообразования (кара멜лизации), то есть вступать во взаимодействие с протеиновыми компонентами среды с образованием сложных белково-углеводных пигментных комплексов темного цвета. Помимо снижения качества питательной среды за счет изменения окраски и потери прозрачности, затрудняется определение концентрации биомассы по стандартам мутности. Для отдельных групп микроорганизмов эти комплексы являются факторами, угнетающими их рост.

Заслуживает внимание работа, в которой авторы с целью снижения негативного влияния образовавшихся пигментных веществ рекомендуют обрабатывать питательную среду активированным углем, который, являясь поверхностно-активным веществом, адсорбирует на своей поверхности большую часть балластных соединений, снижает концентрацию редуцирующих веществ и железа, в результате чего ростовые и культуральные свойства среды существенно повысились. Рекомендуемая доза угля – 2% к объему питательной среды. Повышение дозировки выше указанного значения чревато снижением содержания аминного азота и, как следствие, уменьшением объема получаемой при культивировании биомассы. Следует отметить, что активированный уголь является адсорбентом более широкого спектра действия, и эти его свойства целесообразно проверить на адсорбционную способность других вредных веществ в различных производственных средах.

При проведении стерилизации в потоке создается возможность снижения экспозиции нагрева до нескольких десятков секунд с одновременным повышением температуры до 130-140°C. С учетом того, что образование пигментных веществ является функцией температуры и времени, применение кратковременной высокотемпературной стерилизации питательных сред позволяет избежать влияния этого негативного фактора. Однако, в вакцинном производстве, где объемы питательной среды, как правило, невелики (300-600 л), применение стерилизации в потоке нашло ограниченное применение.

Наиболее важными ростовыми соединениями, по мнению большинства авторов, являются аминокислоты. При этом главенствующую роль играют свободные аминокислоты. Так, установлено, что при культивировании пастерелл в питательной среде для нормального роста и достаточного накопления культуры необходимо присутствие таких аминокислот, как аспарагиновая, глутаминовая, лейцина, изолейцина, тирозина и фенилаланина. Также определено, что исследуемые штаммы не обладают биохимической активностью в отношении белков и липидов, что не совсем совпадает с данными других

авторов, показывающих необходимость наличия в питательных средах этих высокомолекулярных соединений. По всей видимости, данный вопрос требует проведения отдельных исследований. Кроме того, имеются данные, что отдельные аминокислоты, не оказывая существенного влияния на накопление числа клеток, способствуют улучшению их морфологических характеристик. Так, отсутствие в питательной среде при культивировании бактерий рожжи L-аргинина оказало негативное воздействие на их дальнейшие биотехнологические свойства. В то же время, установлено, что при культивировании коринебактерий валин в смеси с лейцином и изолейцином, находящиеся в питательной среде, ингибируют синтез фермента ацетолактсинтазы, играющего важную роль в метаболизме микроорганизмов данного вида, в частности *Corynebacterium glutamicum* и *Brevibacterium lactofermentum*. L-глутамин не является незаменимой аминокислотой, однако играет важную роль биохимических процессах, выполняя роль нейромедиатора. Кроме того, установлено, что глутаминовая кислота в определенных дозах способна заменить метионин. Возможно, что аналогичными свойствами обладают и некоторые другие аминокислоты.

Наиболее универсальными и, как следствие, распространенными являются питательные среды на основе мясных бульонов, переваров и гидролизатов в сочетании с пептоном, а также другими жизненно необходимыми для микроорганизмов добавками. Так, рекомендовано использовать в составе питательных сред ферментативные гидролизаты мышц крупного рогатого скота и ферментолитат биомассы микроорганизмов. Выращенная при этом культура, в частности *Bacteroides nodosus*, отличалась высокой степенью накопления бакмассы, выработанная вакцина обладала достаточными иммуногенными свойствами. При этом себестоимость среды существенно снизилась за счет использования более дешевых компонентов. Положительные результаты получены и при добавлении ферментативного казеиново-дрожжевого гидролизата. Данная среда использовалась для культивирования микобактерий, лептоспир и других микробов. При этом авторы отмечают, что эффект от использования добавок достигается за счет высокого содержания в них липидов, в основном олеиновой и пальмитиновой кислот.

В последнее десятилетие достаточно широкое распространение получили среды, приготовленные из других видов белоксодержащих ингредиентов на основе рыбы, молочного и растительного сырья. Объединяющим моментом для этих сред является высокое содержание легкоусвояемых микробами аминокислот и низкомолекулярных полипептидов. Высокая степень расщепления белка в производстве сред достигается глубокой степенью гидролиза при помощи протеолитических ферментов пепсина, трипсина, протеаз и пептидаз. Глубина гидролиза и качество получаемого гидролизата зависят от вида используемого сырья, его предварительной подготовки, состава ферментной системы и соотношения непосредственно ферментов, температурных режимов и продолжительности процесса, а также ряда других технологических параметров, в частности прозрачности раствора, что достигается осветлением при помощи центрифуг, сепараторов и фильтрацией через селективные пластины из различных полимерных материалов.

С целью снижения стоимости сред проведены научные исследования, рекомендованы к применению и внедрены в реальное производство питательные среды с использованием отходов первичной переработки скота, в частности кровяные сгустки и поджелудочную железу, куриные эмбрионы, а также вторичные продукты молочной и комбикормовой промышленности, микробиологического и биохимического синтеза. При этом отмечено, что на фоне контрольных опытных образцы биопрепаратов отличала высокая степень роста числа бактериальных клеток в экспоненциальной фазе. Выращенные клетки имели типичную морфологию и высокие иммуногенные свойства.

Применение в биотехнологии разнообразного сырья, в том числе непищевого происхождения, существенно повысило показатель его вариабельности или неоднородности, как по компонентному составу, так и по биологическим свойствам. Для

стандартизации конечного результата микробиологического синтеза, что особенно важно в вакцинном производстве, рекомендовано при конструировании питательных сред использовать математическое планирование по многофакторному плану с учетом многокомпонентности сырья, его химического состава и биологических свойств.

Факторы роста и биостимуляторы. Для интенсификации микробиологических процессов и с целью повышения урожайности целесообразно применять так называемые факторы роста. Наиболее широко известными из них являются витамины. Так, имеющиеся данные о роли биотина (витамин Н) в обмене веществ у микроорганизмов показывают, что этот витамин принимает участие в превращении некоторых аминокислот (аспарагиновая кислота, серин, и треонин). Биотин входит в состав активной группы ферментов, катализирующих процесс карбоксилирования жирных кислот с присоединением CO_2 , которое сопровождается удлинением углеродной цепочки жирной кислоты. Инозит также как и биотин является важным фактором роста для дрожжей. Среди изомеров инозита наиболее активным является его изомер мио (мезо) - инозит, который, соединяясь с шестью молекулами фосфорной кислоты, образует инозитфосфорную кислоту, которая в виде своей кальций-магниевого соли получила название фитина. Особенно большое его количество содержится в зерновых культурах и жмыхе. В микробиологическом синтезе инозит используется в составе кукурузного экстракта, добавляемого в питательную среду с целью интенсификации процесса накопления биомассы. Парааминобензойная и фолиевая кислоты являются сопутствующими аминокислотами и также являются факторами роста для целого ряда микроорганизмов, в особенности *L.casei* и *S.faecalis*. Основными источниками данных аминокислот являются печень и дрожжи, что и явилось причиной их широкого применения в биосинтезе в виде гидролизатов. Участие этих аминокислот в обмене веществ заключается в том, что она в виде производных тетрагидрофолиевой кислоты является составной частью (коферментом) ряда ферментов, катализирующих обмен соединений, содержащих один углеродный атом в молекуле: остатков формальдегида - СОН , муравьиной кислоты $-\text{СООН}$, метильных $-\text{СН}_3$ и оксиметильных $-\text{СН}_2\text{ОН}$ - групп. Эти соединения являются исходным материалом для биосинтеза пуриновых оснований, некоторых пиримидиновых оснований, а также серина, гистидина и метионина.

Одним из биостимуляторов, ускоряющих скорость накопления биомассы и ее объем, может служить культуральная жидкость общеизвестного чайного гриба. Установлено, что ТС-1 (как впоследствии был назван этот препарат) за счет высокого накопления аминокислот и других биологически активных компонентов на 20-40% повышает урожайность таких культур, как листерии, пастереллы и сальмонеллы. Вполне возможно, что аналогичным эффектом препарат обладает и в отношении других бактерий.

Добавки биостимуляторов или факторов роста должны быть строго дозированными в связи с тем, что они имеют достаточно высокую стоимость. В ряде случаев ошибочно принимают ускорение роста числа микробных клеток при использовании факторов роста в больших количествах. По всей видимости, в данной ситуации они играют роль адсорбентов вредных веществ, то есть оказывают неспецифическое воздействие. Примером тому может служить сыворотка крови, которая, как известно, обладает способностью адсорбировать жирные кислоты и действовать как буфер. С другой стороны она сама содержит целый ряд жирных кислот, таких как олеиновую, стеариновую и им подобные.

Микроэлементы помимо участия в процессе формирования новых микробных клеток играют роль катализаторов метаболических процессов, поэтому им также приписывается роль факторов роста. Присутствуя в питательной среде в следовых количествах, они, тем не менее, играют значительную роль в регуляции обменных процессов. Большое значение имеют такие зольные элементы, как сера и фосфор, источниками которых являются нуклеотиды, фосфолипиды и коэнзимы. Железо также является катализатором внутриклеточных окислительно-восстановительных процессов, однако потребности микроорганизмов в этом компоненте столь незначительны, что

достаточные его количества могут поступать в субстрат, например, из стекла используемой посуды. В процессе культивирования в микробных клетках происходит накопление ионов калия, которому большинством авторов, исследовавших роль этого микроэлемента в метаболических процессах, отводят функции транспорта питательных веществ в клетку и продуктов жизнедеятельности из клетки в среду. Причем, содержание калия в конце культивирования не зависит от его первоначальной концентрации в среде.

Список литературы, рекомендуемый к использованию по данной теме:

Перечень основной литературы:

1. Залашко М.В. Биотехнология переработки молочной сыворотки. М.: В.О. «Агропромиздат». – 1990. – 192 с.
2. Залашко М.В., Залашко Л.С. Микробный синтез на молочной сыворотке. Минск: Наука и техника. –1990. –274 с.
3. Сидоров М.С., Корнелаева Р.П. Микробиология мяса и мясопродуктов. М.: Колос. –1996. –240 с.
4. Тутов И.К., Ситьков В.И. Основы биотехнологии ветеринарных биопрепаратов. Ставрополь: 1997. –253 с.

Перечень дополнительной литературы:

1. Баснакьян И.А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами.. М.: Медицина. –1992. –192 с.
2. Безбородов А.М. Биосинтез биологически активных веществ микроорганизмами. М.: Медицина. –1969. –246 с.
3. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. М.: Медицина. – 1973. – 456 с.
4. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. М.: Изд-во МГУ. -1989. –294 с.
5. Иванов В.Н. Энергетика роста микроорганизмов. Киев: Наукова думка. –1981. – 140 с.
6. Коротяев А.И. Механизмы саморегуляции бактериальной клетки. М.: Медицина. – 1973. –272 с.
7. Козлов Ю.А. Питательные среды в медицинской биологии. М.: МЕДГИЗ – 1950 – 252 с.
8. Месрбяну Л., Пуэнеску Э. Физиология бактерий. Бухарест: Меридиане. –1963. – 807 с.
9. Мосичев М.С., Складнев А.А., Котов Б.В. Общая технология микробиологических производств. М.: Легкая и пищевая промышленность. –1982. – 264 с.
10. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир. – 1978. –331 с.
11. Практикум по физико-химическим методам в биологии. М.: Изд-во МГУ. –1981. –240 с.
12. Руководство по вакцинному и сывороточному делу. Под ред. Бургасова П.Н. М.: Медицина. –1978. –440 с.
13. Уэбб Ф. Биохимическая технология и микробиологический синтез. Пер. с англ. Швалева П.Е. М.: Медицина. –1969. –560 с.

Методическая литература:

1. Методические указания к лабораторным работам по дисциплине «Виды, использование и регенерация питательных сред».

Интернет-ресурсы:

1. <http://biblioclub.ru> : [ЭБС «Университетская библиотека ONLINE»];
2. <http://diss.rsl.ru> : [Электронная библиотека диссертаций РГБ];
3. <http://e.lanbook.com> : [ЭБС издательства «Лань»];

4. <http://elibrary.ru> : [Научная электронная библиотека eLIBRARY.RU];
5. <http://uisrussia.msu.ru> : [Университетская информационная система РОССИЯ (УИС РОССИЯ)].

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА 5

Тема: *Технология приготовления питательных сред для культивирования микроорганизмов.*

Цель: освоение современных биотехнологических приемов приготовления и контроля качества питательных сред.

Формируемые компетенции:

ПК-1 – способность участвовать в разработке и проектировании технологических процессов согласно принятой в организации технологии производства пищевой и биотехнологической продукции с использованием современных систем автоматизированного проектирования.

ИД-1 ПК-1 Имеет представление о технологии производства и организации производственных и технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-2 ПК-1 Имеет представление об основе технологии производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-3 ПК-1 Может осуществлять входной и технологический контроль качества сырья, полуфабрикатов и готовой продукции для организации рационального ведения технологического процесса производства в целях разработки мероприятий по повышению эффективности производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-4 ПК-1 Использует методы проведения расчетов для проектирования производств биотехнологической продукции для пищевой промышленности, технологических линий, цехов, отдельных участков организаций с использованием систем автоматизированного проектирования и программного обеспечения, информационных технологий при создании проектов вновь строящихся и реконструкции действующих организаций.

ИД-5 ПК-1 Проводит основные технологические процессы производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-6 ПК-1 Осуществляет учет сырья и готовой продукции на базе стандартных и сертификационных испытаний производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности в целях обеспечения нормативов выхода готовой продукции в соответствии с технологическими инструкциями.

ИД-7 ПК-1 Учитывает показатели эффективности технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

Контрольные вопросы:

1. Классификация питательных сред.
2. Особенности гидролиза белкового сырья.
3. Среда для культивирования листерий.
4. Среда для культивирования сальмонелл.
5. Питательная среда для культивирования пастерелл.
6. Среда для культивирования коли-бактерий.
7. Среда для культивирования бифидо-бактерий (КД-5).

Теоретическая часть.

В зависимости от вида культивируемого микроорганизма используют соответствующие питательные среды, которые, прежде всего, отличаются между собой по консистенции: плотные, жидкие и полужидкие. По используемому сырью среды также подразделяются на среды животного и растительного происхождения, а также комбинированные.

Питательные среды должны быть стерильными и, как отмечалось выше, создавать оптимальные условия для жизнедеятельности микроорганизма. Наиболее широко в микробиологическом синтезе используются питательные среды на основе мясо-пептонного бульона (МПБ), мясо-пептонного агара (МПА), мясо-пептонно-печеночного агара (МППА). Однако, в связи с высокой стоимостью мяса, достаточно распространены другие виды сырья животного, растительного происхождения, а также отходы микробиологической промышленности.

Перед употреблением, независимо от происхождения, все белковое сырье проходит стадию гидролиза. Рассмотрим процесс приготовления гидролизата на основе перевара Хоттингера. Мясо крупного рогатого скота средней упитанности, полученное от 2-3 летних животных, освобождают от жира, фасций, сухожилий и измельчают на мясорубке. В реакторе подогревают водопроводную воду до температуры 60-65°C. Полученный фарш

добавляют в воду в соотношении 1,0:1,5. При постоянно включенной мешалке в реактор добавляют двууглекислый натр, снижают температуру до 45°C и добавляют протеолитический фермент – панкреатин. В качестве этого фермента на практике чаще всего используют поджелудочную железу, которую также в виде фарша добавляют в раствор в количестве 30-40% и оставляют для гидролиза на 5-6 суток. Для обеспечения сохранности раствора в него добавляют консервант – хлороформ 1-2%-ной концентрации. Во время гидролиза температура поддерживается в пределах 42°C. Готовый гидролизат должен иметь следующие показатели:

- активная кислотность (pH) - 6.0-6.5;
- содержание аминного азота, мг% - 600-800;
- содержание пептона, % - 2-3.

При наличии данных показателей питательная среда на основе гидролизата Хоттингера обеспечивает достаточно высокое накопление биомассы бактерий.

В ряде случаев проводят химический гидролиз белков: кислотный (реже щелочной) и, как наиболее щадящий, аммиачный. Не исключается, в зависимости от назначения среды, использование комбинированного способа проведения гидролиза, когда одновременно применяются протеолитические ферменты и химические реагенты.

По такой же схеме ведется гидролиз других видов белоксодержащего сырья. Основное требование к применяемому способу: максимальное накопление свободных аминокислот и недопущение их разрушения.

При изготовлении производственных питательных сред необходимо тщательно соблюдать требования технологических инструкций и прописей, так как это является залогом достижения конечной цели в необходимых объемах и с высоким качеством.

В производстве биопрепаратов в качестве основы используется перевар Хоттингера с различными добавками, соотношение которых варьирует в зависимости от вида культивируемого микроорганизма.

Среда для культивирования листерий:

- перевар Хоттингера;
- бактопептон, % - 1;
- натрий хлористый, % - 0,3;
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, % - 0,5;
- KH_2PO_4 , % - 0,3;
- гидролизат печени, % - 2;
- лимоннокислый натр, мг - 400;
- магний сернокислый, мг - 100;
- железо лимоннокислое, мг - 50.

Готовая среда должна иметь следующие показатели:

- активная кислотность, pH - 7,4-7,6;
- содержание аминного азота, мг% - 200-220;
- содержание пептона, % - 1-2;
- содержание триптофана, мг% - 80-100.

Среда для культивирования сальмонелл:

- перевар Хоттингера;
- бактопептон, % - 0,5;
- хлористый натр, % - 0,3;
- Na_2HPO_4 , % - 0,5.

Готовая среда должна иметь следующие показатели:

- активная кислотность, pH - 7,8-8,0;
- содержание аминного азота, мг% - 200-220;
- содержание пептона, % - 0,5;
- хлористого натра, % - 0,3.

Питательная среда для культивирования пастерелл:

- перевар Хоттингера;

- бактопептон, % - 0,5;
- желатин, % - 0,5;
- агар-агар, % - 0,1;
- KH_2PO_4 , % - 0,1;
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, % - 0,3;
- NaCl , % - 0,3.

Готовая среда должна иметь следующие показатели:

- активная кислотность, pH - 8,0;
- содержание аминного азота, мг% - 180-200;
- содержание пептона, % - 0,5.

Среда для культивирования коли-бактерий:

- перевар Хоттингера;
- пептон, % - 0,5;
- хлористый натр, % - 0,3;
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, % - 0,5.

Готовая среда должна иметь следующие показатели:

- активная кислотность, pH - 8,0;
- содержание аминного азота, мг% - 200;
- содержание пептона, % - 0,5.

Среда для культивирования бифидо-бактерий (КД-5):

- дрожжевой автолизат;
- гидролизат казеина триптический, мл/л - 350;
- натр хлористый, % - 0,5;
- L-цистин, % - 0,01;
- агар микробиологический, % - 0,07-0,2.

Готовая среда должна иметь следующие показатели:

- активная кислотность, pH - 8,5.

Список литературы, рекомендуемый к использованию по данной теме:

Перечень основной литературы:

1. Залашко М.В. Биотехнология переработки молочной сыворотки. М.: В.О. «Агропромиздат». – 1990. – 192 с.
2. Залашко М.В., Залашко Л.С. Микробный синтез на молочной сыворотке. Минск: Наука и техника. – 1990. – 274 с.
3. Сидоров М.С., Корнелаева Р.П. Микробиология мяса и мясопродуктов. М.: Колос. – 1996. – 240 с.
4. Тутов И.К., Ситьков В.И. Основы биотехнологии ветеринарных биопрепаратов. Ставрополь: 1997. – 253 с.

Перечень дополнительной литературы:

1. Баснакьян И.А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами.. М.: Медицина. – 1992. – 192 с.
2. Безбородов А.М. Биосинтез биологически активных веществ микроорганизмами. М.: Медицина. – 1969. – 246 с.
3. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. М.: Медицина. – 1973. – 456 с.
4. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. М.: Изд-во МГУ. - 1989. – 294 с.
5. Иванов В.Н. Энергетика роста микроорганизмов. Киев: Наукова думка. – 1981. – 140 с.
6. Коротяев А.И. Механизмы саморегуляции бактериальной клетки. М.: Медицина. – 1973. – 272 с.

7. Козлов Ю.А. Питательные среды в медицинской биологии. М.: МЕДГИЗ – 1950 – 252 с.
8. Месробяну Л., Пуэнеску Э. Физиология бактерий. Бухарест: Меридиане. –1963. – 807 с.
9. Мосичев М.С., Складнев А.А., Котов Б.В. Общая технология микробиологических производств. М.: Легкая и пищевая промышленность. –1982. – 264 с.
10. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир. – 1978. –331 с.
11. Практикум по физико-химическим методам в биологии. М.: Изд-во МГУ. –1981. –240 с.
12. Руководство по вакцинному и сывороточному делу. Под ред. Бургасова П.Н. М.: Медицина. –1978. –440 с.
13. Уэбб Ф. Биохимическая технология и микробиологический синтез. Пер. с англ. Швалева П.Е. М.: Медицина. –1969. –560 с.

Методическая литература:

1. Методические указания к лабораторным работам по дисциплине «Виды, использование и регенерация питательных сред».

Интернет-ресурсы:

1. <http://biblioclub.ru> : [ЭБС «Университетская библиотека ONLINE»];
2. <http://diss.rsl.ru> : [Электронная библиотека диссертаций РГБ];
3. <http://e.lanbook.com> : [ЭБС издательства «Лань»];
4. <http://elibrary.ru> : [Научная электронная библиотека eLIBRARY.RU];
5. <http://uisrussia.msu.ru> : [Университетская информационная система РОССИЯ (УИС РОССИЯ)].

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА №6

Тема: *Питательные среды для микробиологического синтеза и антибиотиков.*

Цель: освоение современных биотехнологических приемов приготовления и контроля качества питательных сред.

Формируемые компетенции:

ПК-1 – способность участвовать в разработке и проектировании технологических процессов согласно принятой в организации технологии производства пищевой и биотехнологической продукции с использованием современных систем автоматизированного проектирования.

ИД-1 ПК-1 Имеет представление о технологии производства и организации производственных и технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-2 ПК-1 Имеет представление об основе технологии производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-3 ПК-1 Может осуществлять входной и технологический контроль качества сырья, полуфабрикатов и готовой продукции для организации рационального ведения технологического процесса производства в целях разработки мероприятий по повышению эффективности производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-4 ПК-1 Использует методы проведения расчетов для проектирования производств биотехнологической продукции для пищевой промышленности, технологических линий, цехов, отдельных участков организаций с использованием систем автоматизированного проектирования и программного обеспечения, информационных технологий при создании проектов вновь строящихся и реконструкции действующих организаций.

ИД-5 ПК-1 Проводит основные технологические процессы производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-6 ПК-1 Осуществляет учет сырья и готовой продукции на базе стандартных и сертификационных испытаний производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности в целях обеспечения нормативов выхода готовой продукции в соответствии с технологическими инструкциями.

ИД-7 ПК-1 Учитывает показатели эффективности технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

Контрольные вопросы:

1. Синтетические питательные среды в синтезе микроорганизмов.
2. Факторы роста и развития организмов при приготовлении питательных сред.
3. Источники углерода и азота, как основных компонентов питательных сред.
4. Влияние температуры и аэрации на качественные изменения питательной среды.
5. Характеристика кукурузного экстракта, как дешевого сырья для микробиологического синтеза.
6. Соевая мука, как источник белковых веществ.
7. Минеральные азотосодержащие вещества в питательных средах.
8. Биосинтез лизина.
9. Биосинтез глутаминовой кислоты (глутамат натрия).
10. Биосинтез триптофана.
11. Антибиотики и их применение.
12. Препараты тетрациклина.
13. Биовит и терравит.
14. Препараты бацитрацина.
15. Низин.

Теоретическая часть.

Одним из основных факторов, влияющих на быстрый рост микроорганизмов и максимальный синтез ими биологически активных веществ, являются специально подобранные синтетические питательные среды. При их подборе следует учитывать ее полноценность, обоснованность и сбалансированность набора различных питательных соединений, необходимых микроорганизму для построения растущей клетки и синтеза конечного целевого продукта.

Для нормального роста и развития микроорганизмов в питательной среде должны присутствовать все элементы, из которых формируется клетка. Многим микроорганизмам для роста в той или иной питательной среде необходим целый ряд дополнительных условий: определенные концентрации водородных ионов, окислительно-восстановительный потенциал среды, требуемые соотношения различных ионов.

Некоторые микроорганизмы с нарушенными наследственными признаками (ауксотрофные мутанты) нуждаются в отдельных факторах роста, которые они сами синтезировать не могут: аминокислотах, пуринах, витаминах и др.

Для получения продуктов микробиологического синтеза в зависимости от микроорганизма-продуцента и технологии производства используются отличные по составу питательные среды. В одном технологическом процессе для получения и размножения посевного материала и для стадии производственного культивирования могут применяться среды различного состава.

При этом основными компонентами питательной среды являются источники углерода и азота.

10-60% стоимости продуктов ферментации приходится на стоимость компонентов среды и, прежде всего на стоимость источников углерода. Для снижения затрат в микробиологическом производстве обычно применяют дешевые среды, приготовленные на основе сырья растительного происхождения.

В качестве источника углерода чаще всего используются злаковый крахмал, мелассу, декстрозу, растительное масло, метанол, этанол, n-парафины, целлюлозу, лактозу, уксусную кислоту и др. Считается, что комплексные азотистые вещества (как и углеродные) выгоднее использовать, чем аммоний или его соли, поскольку они обеспечивают высокую скорость ферментации и конверсии, так как содержат дополнительные питательные вещества. В комплексных источниках могут присутствовать не утилизируемые компоненты, которые необходимо отделять от конечного продукта и, соответственно, утилизировать. Кроме того, при наличии простого источника углерода, гораздо легче осуществлять контроль и регуляцию процесса. Использование недорогих питательных веществ известного состава в качестве источников азота более целесообразно для таких процессов, высокую стоимость которых в большей степени определяет собственно процесс ферментации, а не накопление конечного продукта.

При приготовлении сред в промышленных масштабах учитывается состав ингредиентов, качество сырья, вариабельность его химического состава от партии к партии, соотношение C/N, содержание примесей и другие факторы. Для приготовления питательных сред существует четкий, строго регламентированный порядок растворения или суспендирования ингредиентов, изменение значения pH до и после стерилизации.

Изменение температуры (при стерилизации) и аэрации среды вызывают ее качественные изменения, которые существенным образом влияют на динамику процесса культивирования микроорганизмов и, соответственно, накопления целевого продукта.

Наиболее характерным углеродсодержащим сырьем в микробиологическом синтезе являются углеводы. Углеводы – одна из важнейших составных частей питательных сред для выращивания микроорганизмов. Они используются для синтеза клеточных структур и одновременно, как было отмечено выше, служат источниками энергии. В качестве источника углерода в промышленном биосинтезе используют глюкозу и крахмал. В среды для культивирования вводят техническую глюкозу или маточник (гидрол), остающийся после выделения кристаллической глюкозы. Гидрол содержит до 50% редуцирующих сахаров (в пересчете на глюкозу).

При введении в среду технических продуктов их количество рассчитывают по содержанию редуцирующих веществ в пересчете на чистые углеводы. Так, в частности, поступают при использовании в качестве углеродсодержащего сырья отходов переработки сельскохозяйственного сырья: подсолнечная лузга, кукурузные кочерыжки, древесная щепка и др.

Крахмал на 95-97% состоит из полисахаридов, при кислотном гидролизе образующих глюкозу, поэтому может быть использован теми микроорганизмами, которые способны к синтезу амилолитических ферментов.

Биосинтез многих биологически активных веществ осуществляется на питательных средах сложного и зачастую непостоянного химического состава. Практически это доступное и дешевое для конкретного региона сырье, содержащее белки, полипептиды

или свободные аминокислоты. Чаще всего для этих целей используется кукурузный экстракт, содержащий большинство необходимых для микробного синтеза соединения: белки, крахмал, растворимые углеводы, молочная кислота, минеральные вещества и так далее. Примерный аминокислотный состав кукурузного экстракта составляет, г/кг СВ:

- глицин	- 18,17;
- аланин	- 24,70;
- валин	- 19,64;
- лейцин	- 35,38;
- изолейцин	- 6,57;
- серин	- 17,65;
- треонин	- 14,05;
- аспарагиновая кислота	- 26,88;
- глутаминовая кислота	- 64,95;
- лизин	- 16,72;
- аргинин	- 14,81;
- цистин	- 0,26;
- метионин	- 6,60;
- фенилаланин	- 12,77;
- пролин	- 33,08;
- тирозин	- 8,28;
- гистидин	- 14,36.

Из приведенных данных следует, что сравнительно недорогое сырье содержит практически весь набор аминокислот, необходимых для жизнедеятельности микроорганизмов и, соответственно, продуцирования ими необходимых биологически-активных соединений.

Белковыми веществами также богата соевая мука, которая, также как и кукурузный экстракт, содержит все необходимые аминокислоты, однако, они в реальности представлены в виде высокомолекулярных белков, которые для придания им необходимых качеств необходимо подвергнуть гидролизу.

Из минеральных азотсодержащих веществ наиболее часто применяют аммонийные соли серной, соляной или азотной кислот. Как показала практика, сульфат аммония оказался наиболее пригодным для биосинтеза многих природных соединений. В соединениях, содержащих аммонийный азот, ион аммония находится в химической связи с анионом какой-либо кислоты, например серной или фосфорной. При этом потребность микроорганизма в сере или фосфоре гораздо ниже, чем в азоте. В этой связи при биосинтезе в питательной среде накапливаются анионы с закономерным повышением титруемой кислотности. В этой связи, с целью стабилизации данного параметра, при культивировании в среду добавляют стабилизаторы, в частности - мел. В противном случае снижение кислотности достигают подтитровкой щелочью.

В производстве биологически – активных веществ существует много вариантов и рецептов питательных сред, продуцирующих накопление биомассы микроорганизмов и, соответственно, синтез целевого продукта. При этом наиболее важным, как отмечалось выше, является обеспечение интенсивного роста популяции и создание фактора лимитирования, без которого синтез целевого продукта невозможен.

Биосинтез лизина осуществляется микроорганизмами рода *Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Corinebacterium* и др. В качестве источника углерода данные микроорганизмы используют свекловичную мелассу, кукурузный экстракт, белковые гидролизаты. Источниками азота также служат соли аммония и мочевины. При биосинтезе в качестве факторов роста используются биотин, гомосерин, метионин и треонин. Для *Brevibacterium*, в частности, используют питательную среду, содержащую в 1 л:

- метионин, мг	- 200;
- треонин, мг	- 800;
- биотин, мкг	- 15-20.

При получении кормового концентрата лизина используется питательная среда следующего состава:

- | | |
|---|---------|
| - меласса (содержание сахара 46% от СВ),% | - 16,3; |
| - экстракт кукурузный (содержание СВ 50%),% | - 2; |
| - сульфат аммония, % | - 2; |
| - KH_2PO_4 , % | - 0,05; |
| - K_2HPO_4 , % | - 0,05; |
| - мел, % | - 1. |

Полученная среда должна иметь активную кислотность (pH) 6,9-7,0.

Биосинтез глутаминовой кислоты (глутамат натрия) ведется по пути создания оптимальных условий для жизнедеятельности бактерий семейства *Pseudomonas*, *Escherichia* или дрожжей рода *Candida*. В общем виде белоксодержащее сырье после гидролиза в результате реакции гидроформилирования превращается в В-формилпропионнитрил, который через стадию образования А-аминоглутардинитрила превращается в D- и L- изомеры. В дальнейшем необходимо выделить L-изомер из раствора. Возможен путь получения L-глутаминовой кислоты из А-кетоглутаровой кислоты переаминированием аминокислот и восстановительным аминированием. В обоих случаях А-кетоглутаровая кислота является предшественницей L-глутаминовой кислоты.

Накопление глутаминовой кислоты в количестве 50 г на 1 л среды достигается при следующих количественных параметрах ингредиентов, %:

- | | |
|----------------------------|-----------|
| - сахароза | - 8,5-10; |
| - мочевины | - 0,5; |
| - меласса | - 1,2; |
| - сульфат марганца | - 0,01; |
| - KH_2PO_4 | - 0,01; |
| - K_2HPO_4 | - 0,01. |

Биосинтез триптофана ведется путем микробного синтеза на основе бактерий *E. coli*, *Bac. subtilis* и дрожжей вида *Candida utilis*. Производственная питательная среда в одном из вариантов имеет следующий состав, %:

- | | |
|----------------------------|---------|
| - меласса | - 10,4; |
| - мочевины | - 0,5; |
| - K_2HPO_4 | - 0,01; |
| - MgSO_4 | - 0,05; |
| - CaCl_2 | - 0,01. |

Активную кислотность среды устанавливают в пределах 7,5-8,0. При культивировании, в частности дрожжей, в течение 144 часов накопление триптофана составляет 6 г/л.

Антибиотики или антибиотические вещества – это продукты обмена микроорганизмов, способные избирательно подавлять или убивать бактерии, микроскопические грибы, вирусы и др., а также задерживать или полностью подавлять развитие некоторых злокачественных новообразований. Образование антибиотиков – одна из форм проявления антагонизма. Специфичным при синтезе антибиотиков является то, что одно и то же соединение образуют различные микроорганизмы. В то же время один и тот же микроб в зависимости от создаваемых условий способен синтезировать различные антибиотики.

Препараты тетрациклина на практике представлены в основном 7-хлортетрациклином и 5-окситетрациклином.

В качестве продуцента хлортетрациклина используют штаммы культуры *Act. aureofaciens*, окситетрациклина – *Act. rimosus*. Для культивирования актиномицетов используют питательную среду следующего состава:

- | | |
|--------------------------|--------|
| - кукурузная мука, % | - 6; |
| - кукурузный экстракт, % | - 1,5; |

- сернокислый аммоний, % - 0,6;
- хлористый натр, % - 0,4;
- мел, % - 0,8;
- жир кашалотовый, % - 1,5-2,0.

При культивировании рекомендуется добавлять в среду хлорид кобальта из расчета 1 г на 1 м³. Выращивание культуры длится в течение 100-120 час при непрерывной аэрации и температуре 26-28°C.

Биовит и терравит являются разновидностью тетрациклина и в основном используются в виде кормовой добавки в животноводстве. В качестве культур-продуцентов также используются *Act. rimosus* и *Act. aerofaciens*. Производственное культивирование производят на среде следующего состава:

- барда зерно-картофельная, % - 10;
- мука (крахмалистость не ниже 51%), % - 5,0;
- NH₄NO₃, % - 0,7;
- CaCO₃, % - 0,5;
- NaCl, % - 0,3;
- CaCl₂, % - 0,0001;
- бензил роданистый, % - 0,0001;
- жир кашалотовый, % - 0,2.

Оптимальное значение pH среды должно быть в пределах 6,6-6,7. Длительность культивирования 60-70 час, температура 26-28°C. Процесс ведется при непрерывной аэрации и периодическом перемешивании. Окончание культивирования сопровождается незначительным повышением pH среды – до – 6,9-7,2. К этому моменту активность глубинной культуры достигает более 3000 ед/мл.

Препараты бацитрацина – полипептидные антибиотики, выделенные при культивировании *Bac. licheniformis* на питательной среде следующего состава:

- крахмал, % - 2,0;
- сульфат магния, % - 0,33;
- мука соевая, % - 7,5;
- карбонд кальция, % - 1,0;
- кашалотовый жир, % - 0,2.

Активная кислотность среды 7,0. Температура культивирования 37°C, продолжительность процесса 30-40 час. Активность антибиотика в конце процесса должна составлять 4000 ед/мл.

Низин – один из немногих антибиотиков, разрешенных к применению в пищевой промышленности. При попадании в пищевую тракт человека он быстро разрушается ферментами до аминокислот.

Низин продуцируется штаммами *Str. lactis*. Наиболее благоприятной средой для развития данной культуры и, соответственно, синтеза низина, является обезжиренное молоко. При использовании сыворотки выход антибиотика снижается примерно в два раза. Тем не менее, при добавлении к сыворотке 25% пепсинового гидролизата молочнокислых бактерий, картофельной патоки или глюкозы (2,5-5,0%) выход повышается на 90%.

Производственное культивирование ведется на смеси гидролизата с творожной или подсырной сывороткой в соотношении 1:2. Гидролизат получают в результате гидролиза обезжиренного молока с 6%-ным содержанием сухих веществ протеолитическим ферментом панкреатином при температуре 45°C и pH смеси 8,1 в течение 24 часов. За это время активность препарата достигает значения 100 мкг/мл.

Список литературы, рекомендуемый к использованию по данной теме:

Перечень основной литературы:

1. Залашко М.В. Биотехнология переработки молочной сыворотки. М.: В.О. «Агропромиздат». – 1990. – 192 с.

2. Залашко М.В., Залашко Л.С. Микробный синтез на молочной сыворотке. Минск: Наука и техника. –1990. –274 с.

3. Сидоров М.С., Корнелаева Р.П. Микробиология мяса и мясопродуктов. М.: Колос. –1996. –240 с.

4. Тутов И.К., Ситьков В.И. Основы биотехнологии ветеринарных биопрепаратов. Ставрополь: 1997. –253 с.

Перечень дополнительной литературы:

1. Баснакьян И.А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами.. М.: Медицина. –1992. –192 с.

2. Безбородов А.М. Биосинтез биологически активных веществ микроорганизмами. М.: Медицина. –1969. –246 с.

3. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. М.: Медицина. – 1973. – 456 с.

4. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. М.: Изд-во МГУ. -1989. –294 с.

5. Иванов В.Н. Энергетика роста микроорганизмов. Киев: Наукова думка. –1981. – 140 с.

6. Коротяев А.И. Механизмы саморегуляции бактериальной клетки. М.: Медицина. – 1973. –272 с.

7. Козлов Ю.А. Питательные среды в медицинской биологии. М.: МЕДГИЗ – 1950 – 252 с.

8. Месробяну Л., Пуэнеску Э. Физиология бактерий. Бухарест: Меридиане. –1963. – 807 с.

9. Мосичев М.С., Складнев А.А., Котов Б.В. Общая технология микробиологических производств. М.: Легкая и пищевая промышленность. –1982. – 264 с.

10. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир. – 1978. –331 с.

11. Практикум по физико-химическим методам в биологии. М.: Изд-во МГУ. –1981. –240 с.

12. Руководство по вакцинному и сывороточному делу. Под ред. Бургасова П.Н. М.: Медицина. –1978. –440 с.

13. Уэбб Ф. Биохимическая технология и микробиологический синтез. Пер. с англ. Швалева П.Е. М.: Медицина. –1969. –560 с.

Методическая литература:

1. Методические указания к лабораторным работам по дисциплине «Виды, использование и регенерация питательных сред».

Интернет-ресурсы:

1. <http://biblioclub.ru> : [ЭБС «Университетская библиотека ONLINE»];

2. <http://diss.rsl.ru> : [Электронная библиотека диссертаций РГБ];

3. <http://e.lanbook.com> : [ЭБС издательства «Лань»];

4. <http://elibrary.ru> : [Научная электронная библиотека eLIBRARY.RU];

5. <http://uisrussia.msu.ru> : [Университетская информационная система РОССИЯ (УИС РОССИЯ)].

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА №7.

Тема: *Питательные среды для синтеза органических кислот и витаминов.*

Цель: освоение современных биотехнологических приемов приготовления и контроля качества питательных сред.

Формируемые компетенции:

ПК-1 – способность участвовать в разработке и проектировании технологических процессов согласно принятой в организации технологии производства пищевой и биотехнологической продукции с использованием современных систем автоматизированного проектирования.

ИД-1 ПК-1 Имеет представление о технологии производства и организации производственных и технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-2 ПК-1 Имеет представление об основе технологии производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-3 ПК-1 Может осуществлять входной и технологический контроль качества сырья, полуфабрикатов и готовой продукции для организации рационального ведения технологического процесса производства в целях разработки мероприятий по повышению эффективности производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-4 ПК-1 Использует методы проведения расчетов для проектирования производств биотехнологической продукции для пищевой промышленности, технологических линий, цехов, отдельных участков организаций с использованием систем автоматизированного проектирования и программного обеспечения, информационных технологий при создании проектов вновь строящихся и реконструкции действующих организаций.

ИД-5 ПК-1 Проводит основные технологические процессы производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-6 ПК-1 Осуществляет учет сырья и готовой продукции на базе стандартных и сертификационных испытаний производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности в целях обеспечения нормативов выхода готовой продукции в соответствии с технологическими инструкциями.

ИД-7 ПК-1 Учитывает показатели эффективности технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

Контрольные вопросы:

1. Питательная среда для синтеза лимонной кислоты.
2. Питательная среда для синтеза уксусной кислоты.
3. Питательная среда для синтеза молочной кислоты.
4. Питательная среда для синтеза витамина B12 .
5. Питательная среда для синтеза витамина B2 (рибофлавина).
6. Питательная среда для синтеза витамина C (аскорбиновой кислоты).

Теоретическая часть.

Питательная среда для синтеза лимонной кислоты. В производственных условиях лимонную кислоту целиком получают путем ферментации. Продуцентами являются грибы, бактерии и другие формы. На практике в основном используются мутанты *Asp. niger* и *Asp. wenti*, а также некоторые штаммы дрожжей. Аспергиллы образуют больше лимонной кислоты по сравнению с пенициллами, кроме того, образование побочных продуктов (щавелевой, изолимонной и глюконовой кислот) у этих мутантов может быть в значительной степени подавлено.

С учетом многообразия используемого сырья для синтеза лимонной кислоты рекомендуемый компонентный состав питательной среды следующий:

- | | |
|---|--------------|
| - редуцирующие сахара (меласса, сахароза), % | - 14-15; |
| - источники азота, % | - 0,25; |
| - KH_2PO_4 , % | - 0,10-0,15; |
| - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, % | - 0,02-0,25; |
| - меласные среды, % | - 5,0-6,0; |
| - сахарозные среды, % | - 2,0-3,0. |

Активная кислотность среды 5,0-6,0.

Культивирование ведется поверхностным способом в металлических (алюминий) кюветах в стерильных помещениях при температуре окружающего воздуха 28-30°C и относительной влажности 40-60% в течение 8-12 дней.

Поверхностное культивирование можно проводить и на твердом субстрате, чаще всего на пшеничных отрубях или картофельной пульпе, разложенных слоем толщиной 3-5 см. Активную кислотность отрубей устанавливают равной 4,0-5,0 перед стерилизацией. Для активизации процесса в среду целесообразно добавлять α -амилазу.

При погружном способе, который является более прогрессивным, ферментацию ведут в две стадии, одна из которых ростовая, другая продукционная. На первом этапе получают непосредственно культуру спор, на второй – синтез целевого продукта. В обоих случаях для нормального роста культуральную жидкость интенсивно аэрируют стерильным воздухом.

Питательная среда для синтеза уксусной кислоты. В качестве субстрата используется спирто- и сахаросодержащее сырье. В случае, если уксус готовят из пищевого сырья (вина, сыворотка молочная, сусла, сидры и т.д.), его используют без добавок каких-либо ингредиентов. При использовании технического спирта, картофельного или зернового крахмала и т.д., в среду добавляют фосфат аммония, $MgSO_4$, цитраты и пантотенаты кальция, сусла. Причем, при глубинном культивировании концентрация питательных веществ должна быть в 5 раз выше, чем при поверхностном способе выращивания культуры. Установлено, что применение питательной среды с оптимальным аминокислотным пулом приводит к значительному повышению продуктивности процесса.

В качестве продуцентов уксусной кислоты на практике применяются анаэробные бактерии, способные к образованию ацетата из углекислого газа при брожении сахаров, в автотрофных условиях роста – из $CO_2 + H_2$, при использовании CO , формиата и метанола. К числу таких бактерий относятся клостридии, аспергиллы, сульфатредуцирующие бактерии и ряд других.

Питательная среда для синтеза молочной кислоты. Для получения молочной кислоты используют в основном гомоферментативные молочнокислые бактерии. К их характерным особенностям относят следующее:

- способность к продуцированию молочной кислоты (до 1,5% и выше);
- высокая кислотоустойчивость (способность развиваться при pH 3,5 и ниже);
- спиртоустойчивость (выдерживают до 16% этанола).

В качестве субстрата в биотехнологии молочной кислоты используется широкий спектр углеводсодержащего сырья, в том числе отходов многих производств: мелассу, осахаренный картофельный затвор, к которым в качестве источника витаминов и аминокислот добавляют солодовый и кукурузный экстракт, а также источники азота и фосфора. Наиболее высокую результативность (до 86% выхода молочной кислоты) удалось получить при использовании в качестве субстрата D-глюкозы. При использовании молочной сыворотки выход кислоты составил 70%, если же сыворотку деминерализовали, то выход увеличивался до 80%. С целью многократного использования продуцентов на практике применяют иммобилизованную на альгинате кальция культуру *L. plantarum*.

Питательная среда для синтеза витамина B_{12} . В зависимости от используемого продуцента меняется и состав питательной среды. Так, достаточно высокое накопление витамина было получено при культивировании штаммов *Propionibacterium shermanii* и *Pseudomonas denitrificans*. В производстве чаще всего используют культуру пропионобактерий, которые позволяют накапливать в культуральной жидкости до 60 мг/л витамина. Бактерии культивируют с аэрацией или с интенсивным перемешиванием в периодических условиях в среде следующего состава:

- | | |
|-----------------------------|------------|
| - свеклосахарная меласса, % | - 10; |
| - дрожжевой экстракт, % | - 0,02; |
| - $(NH_4)_2HPO_4$, % | - 0,05; |
| - $MgSO_4$, % | - 0,03; |
| - $MnSO_4$, % | - 0,002; |
| - $CoNO_3$, % | - 0,00188; |

- 5,6-диметилбензимидазол, %	- 0,00025;
- ZnSO ₄ , %	- 0,0002;
- Na ₂ MoO ₃ , %	- 0,0005.

Активная кислотность питательной среды поддерживается в пределах 7,4. Инкубирование осуществляется при 29°C в течение 90 часов.

Питательная среда для синтеза витамина В₂ (рибофлавина). Продуценты витамина подразделяются на сильные, умеренные и слабые. В производстве из культур, относящихся к первому виду, наиболее широко применяются *Eremothecium ashbyii* и *Ashbya gossypii*, способные синтезировать от 2,5 до 6,5 г/л рибофлавина в среде следующего состава:

- кукурузный экстракт, %	- 2,25;
- пептон, %	- 3,5;
- соевое масло, %	- 4,5.

Стимуляцию синтеза рекомендуется производить путем добавления различных пептонов, глицина, барды после отгонки спирта или дрожжевого экстракта. Следует отметить, что соевое масло в состав среды вносят в основном в качестве антивспенивателя, так как процесс культивирования необходимо сопровождать интенсивной аэрацией. pH среды составляет 7,0, продолжительность ферментации 7 суток при температуре 28°C.

Питательная среда для синтеза витамина С (аскорбиновой кислоты). Для синтеза витамина С в основном используется *Acetobacter xylinum*, несколько реже *Aspergillus suboxydans*. Питательная среда для данных культур состоит в основном из сорбита (10-20%), в качестве источника азота добавляют кукурузный экстракт (0,1-0,3%). Для стабилизации pH в среду добавляют мел. Культивирование проводят при температуре 30-35°C в течение 24 часов при интенсивной аэрации. Замечено, что при замене атмосферного воздуха кислородом интенсивность ферментации повышается.

Список литературы, рекомендуемый к использованию по данной теме:

Перечень основной литературы:

1. Залашко М.В. Биотехнология переработки молочной сыворотки. М.: В.О. «Агропромиздат». – 1990. – 192 с.
2. Залашко М.В., Залашко Л.С. Микробный синтез на молочной сыворотке. Минск: Наука и техника. – 1990. – 274 с.
3. Сидоров М.С., Корнелаева Р.П. Микробиология мяса и мясопродуктов. М.: Колос. – 1996. – 240 с.
4. Тутов И.К., Ситьков В.И. Основы биотехнологии ветеринарных биопрепаратов. Ставрополь: 1997. – 253 с.

Перечень дополнительной литературы:

1. Баснакьян И.А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами. М.: Медицина. – 1992. – 192 с.
2. Безбородов А.М. Биосинтез биологически активных веществ микроорганизмами. М.: Медицина. – 1969. – 246 с.
3. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. М.: Медицина. – 1973. – 456 с.
4. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. М.: Изд-во МГУ. – 1989. – 294 с.
5. Иванов В.Н. Энергетика роста микроорганизмов. Киев: Наукова думка. – 1981. – 140 с.
6. Коротяев А.И. Механизмы саморегуляции бактериальной клетки. М.: Медицина. – 1973. – 272 с.

7. Козлов Ю.А. Питательные среды в медицинской биологии. М.: МЕДГИЗ – 1950 – 252 с.
8. Месробяну Л., Пуэнеску Э. Физиология бактерий. Бухарест: Меридиане. –1963. – 807 с.
9. Мосичев М.С., Складнев А.А., Котов Б.В. Общая технология микробиологических производств. М.: Легкая и пищевая промышленность. –1982. – 264 с.
10. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир. – 1978. –331 с.
11. Практикум по физико-химическим методам в биологии. М.: Изд-во МГУ. –1981. –240 с.
12. Руководство по вакцинному и сывороточному делу. Под ред. Бургасова П.Н. М.: Медицина. –1978. –440 с.
13. Уэбб Ф. Биохимическая технология и микробиологический синтез. Пер. с англ. Швалева П.Е. М.: Медицина. –1969. –560 с.

Методическая литература:

1. Методические указания к лабораторным работам по дисциплине «Виды, использование и регенерация питательных сред».

Интернет-ресурсы:

1. <http://biblioclub.ru> : [ЭБС «Университетская библиотека ONLINE»];
2. <http://diss.rsl.ru> : [Электронная библиотека диссертаций РГБ];
3. <http://e.lanbook.com> : [ЭБС издательства «Лань»];
4. <http://elibrary.ru> : [Научная электронная библиотека eLIBRARY.RU];
5. <http://uisrussia.msu.ru> : [Университетская информационная система РОССИЯ (УИС РОССИЯ)].

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА №8.

Тема: *Регулирование компонентного состава биологических жидкостей с помощью биомембранных технологий.*

Цель: освоение современных биотехнологических приемов приготовления и контроля качества питательных сред.

Формируемые компетенции:

ПК-1 – способность участвовать в разработке и проектировании технологических процессов согласно принятой в организации технологии производства пищевой и биотехнологической продукции с использованием современных систем автоматизированного проектирования.

ИД-1 ПК-1 Имеет представление о технологии производства и организации производственных и технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-2 ПК-1 Имеет представление об основе технологии производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-3 ПК-1 Может осуществлять входной и технологический контроль качества сырья, полуфабрикатов и готовой продукции для организации рационального ведения технологического процесса производства в целях разработки мероприятий по повышению эффективности производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-4 ПК-1 Использует методы проведения расчетов для проектирования производств биотехнологической продукции для пищевой промышленности, технологических линий, цехов, отдельных участков организаций с использованием систем автоматизированного проектирования и программного обеспечения, информационных технологий при создании проектов вновь строящихся и реконструкции действующих организаций.

ИД-5 ПК-1 Проводит основные технологические процессы производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-6 ПК-1 Осуществляет учет сырья и готовой продукции на базе стандартных и сертификационных испытаний производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности в целях обеспечения нормативов выхода готовой продукции в соответствии с технологическими инструкциями.

ИД-7 ПК-1 Учитывает показатели эффективности технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

Контрольные вопросы:

1. Регулирование компонентного состава биологических жидкостей с помощью биомембранных технологий;
2. Глубокое фракционирование вторичного молочного сырья;
3. Способ переработки жидкостей электродиализом;
4. Применение мембранных и других специальных методов для фракционирования биологических растворов.

Теоретическая часть.

Регулирование компонентного состава биологических жидкостей с помощью биомембранных технологий. Как отмечалось, в пищевой биотехнологии создан теоретический фундамент и накоплен значительный практический опыт по максимальному использованию всех компонентов растительного и животного сырья при конструировании новых форм продуктов питания, кормов для сельскохозяйственных животных и технических полуфабрикатов. Содержательная часть термина «биомембранная технология» применительно к переработке сельскохозяйственного сырья сформулированы и развиты в работах академиков В.Н. Голубева и Н.Н. Липатова. Схематично процесс переработки сырья можно представить в виде концепции, согласно которой на первом этапе пищевой биотехнологии вырабатывается основной продукт по классической технологии, например высокобелковые молочные продукты. На втором этапе переработки, причем более глубокой, подвергается новый вид сырья - сыворотка, из которой извлекается целый комплекс биологически полноценных компонентов молока: сывороточные белки, лактоза, лактулоза и ряд других. На третьем этапе извлеченные компоненты вновь вовлекаются в сферу производства с целью получения новых видов комбинированных продуктов питания. Причем последние имеют, как правило, более выраженные диетические и лечебно-профилактические свойства, так как их компонентный состав строго оптимизирован.

Наиболее глубокому фракционированию вторичное молочное сырье подвергается на втором этапе, когда его требуется разделить на белковую, углеводную и минеральную составляющие. Фактическим неиспользуемым отходом при этом остается вода и незначительная часть минеральных солей. Наряду с решением важной народнохозяйственной задачи по вовлечению в пищевой рацион населения дополнительных источников сырья снимается экологическая проблема по утилизации белоксодержащих отходов производства.

Использование мембранных методов при обработке биологических жидкостей позволяет, как отмечалось выше, осуществлять их глубокое фракционирование по компонентному составу с образованием двух новых растворов. В этом заключается принципиальное отличие мембранных методов от обычной фильтрации, при которой, как правило, образуется твердый осадок. Так, применение ультрафильтрации, способствует разделению исходной системы на две, в одной из которых находятся высокомолекулярные соединения, в частности - белки, а также микробные клетки, во второй - растворенные низкомолекулярные соединения, основном минеральные вещества.

В зависимости от типа применяемых мембран имеется реальная техническая возможность концентрирования сложных растворов с образованием в качестве пермеата чистой воды. Этот процесс весьма энергоемкий и применяется ограниченно, в основном при проведении научных исследований. Таким образом, принципиально не отличаясь, мембранные методы условно подразделяются на микро-, ультра-, нанофильтрацию и обратный осмос.

Заслуживает внимания способ переработки жидкостей электродиализом, где фракционирование осуществляется через ионоселективные мембраны под действием постоянного тока. Первоначально данный электромембранный процесс применялся для опреснения соленой воды в условиях, где питьевая вода отсутствовала или ее доставка являлась экономически нецелесообразной. В дальнейшем, по мере изучения возможностей электродиализа, сфера его применения существенно расширилась, включая различные направления пищевой биотехнологии, где необходимо целевое направленное регулирование компонентного состава системы для придания ей заданных свойств. Особенно эффективно при электродиализной обработке удаляются катионы одновалентных металлов и органические кислоты с низким молекулярным весом. Комбинирование ультрафильтрации и электродиализа существенно расширяет диапазон возможностей обоих методов. Такой технологический прием получил название каскадного. За рубежом созданы и эксплуатируются электродиализные установки, имеющие в одном пакете одновременно ультрафильтрационные и ионоселективные мембраны.

В микробиологической промышленности из мембранных методов нашла применение в основном ультрафильтрация и ее аналоги, используемые для концентрирования микробных клеток живых культур и так называемой «холодной стерилизации» компонентов сыворотки крови, а также для получения нативных альбуминовых, глобулиновых и специфических белковых ингредиентов питательных сред и других биологических растворов.

Имеется информация о применении мембранных и других специальных методов для фракционирования биологических растворов. Так, с помощью DEAE-целлюлозы удалось выделить РНК-лигазу в количествах достаточных для проведения научных исследований. Положительные результаты получены при извлечении инвертазы с помощью ультрафильтрационных мембран типа Рипор путем 15-20-кратного концентрирования культуральной жидкости. Разработана технология и установка для препаративного выделения ДНК путем фракционирования в гелях агарозы или полиакриламида. Модификация этой установки позволяет осуществлять фракционирование биологических объектов в потоке под воздействием электрического поля в потоке циркулирующего буферного раствора. Однако эти приборы предназначены

для проведения ПРАКТИЧЕСКИХ исследований ввиду их незначительной производительности и невозможности в данной связи использования в производстве. Развитие данного направления в связи с созданием мембран нового поколения позволило разработать конструкцию электродиализной установки, которая в различных модификациях нашла применение в различных сферах промышленности, в частности пищевой биотехнологии. Возможности электродиализа, несмотря на определенный научный и практический интерес, в биологической промышленности до сегодняшнего дня используются крайне недостаточно, несмотря на то, что с помощью данного электромембранного метода имеется реальная возможность целевого и направленного регулирования физико - химических свойств и состава питательных сред без применения химических соединений и реагентов, в частности кислот и щелочей, для корректировки активной и титруемой кислотности, целевого и направленного регулирования компонентного состава и других, не менее важных параметров жидких биологических систем. Это в свою очередь позволяет устанавливать величины осмотического давления, окислительно-восстановительного потенциала в заданных, оптимальных для развития микроорганизмов пределах.

Список литературы, рекомендуемый к использованию по данной теме:

Перечень основной литературы:

1. Залашко М.В. Биотехнология переработки молочной сыворотки. М.: В.О. «Агропромиздат». – 1990. – 192 с.
2. Залашко М.В., Залашко Л.С. Микробный синтез на молочной сыворотке. Минск: Наука и техника. –1990. –274 с.
3. Сидоров М.С., Корнелаева Р.П. Микробиология мяса и мясопродуктов. М.: Колос. –1996. –240 с.
4. Тутов И.К., Ситьков В.И. Основы биотехнологии ветеринарных биопрепаратов. Ставрополь: 1997. –253 с.

Перечень дополнительной литературы:

1. Баснакьян И.А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами.. М.: Медицина. –1992. –192 с.
2. Безбородов А.М. Биосинтез биологически активных веществ микроорганизмами. М.: Медицина. –1969. –246 с.
3. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. М.: Медицина. – 1973. – 456 с.
4. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. М.: Изд-во МГУ. -1989. –294 с.
5. Иванов В.Н. Энергетика роста микроорганизмов. Киев: Наукова думка. –1981. – 140 с.
6. Коротяев А.И. Механизмы саморегуляции бактериальной клетки. М.: Медицина. – 1973. –272 с.
7. Козлов Ю.А. Питательные среды в медицинской биологии. М.: МЕДГИЗ – 1950 – 252 с.
8. Месробяну Л., Пуэнеску Э. Физиология бактерий. Бухарест: Меридиане. –1963. – 807 с.
9. Мосичев М.С., Складнев А.А., Котов Б.В. Общая технология микробиологических производств. М.: Легкая и пищевая промышленность. –1982. – 264 с.
10. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир. – 1978. –331 с.
11. Практикум по физико-химическим методам в биологии. М.: Изд-во МГУ. –1981. –240 с.
12. Руководство по вакцинному и сывороточному делу. Под ред. Бургасова П.Н. М.: Медицина. –1978. –440 с.

13. Уэбб Ф. Биохимическая технология и микробиологический синтез. Пер. с англ. Швалева П.Е. М.: Медицина. –1969. –560 с.

Методическая литература:

1. Методические указания к лабораторным работам по дисциплине «Виды, использование и регенерация питательных сред».

Интернет-ресурсы:

1. <http://biblioclub.ru> : [ЭБС «Университетская библиотека ONLINE»];
2. <http://diss.rsl.ru> : [Электронная библиотека диссертаций РГБ];
3. <http://e.lanbook.com> : [ЭБС издательства «Лань»];
4. <http://elibrary.ru> : [Научная электронная библиотека eLIBRARY.RU];
5. <http://uisrussia.msu.ru> : [Университетская информационная система РОССИЯ (УИС РОССИЯ)].

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА №9.

Тема: *Химическое исследование питательных сред.*

Цель: освоение современных биотехнологических приемов приготовления и контроля качества питательных сред.

Формируемые компетенции:

ПК-1 – способность участвовать в разработке и проектировании технологических процессов согласно принятой в организации технологии производства пищевой и биотехнологической продукции с использованием современных систем автоматизированного проектирования.

ИД-1 ПК-1 Имеет представление о технологии производства и организации производственных и технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-2 ПК-1 Имеет представление об основе технологии производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-3 ПК-1 Может осуществлять входной и технологический контроль качества сырья, полуфабрикатов и готовой продукции для организации рационального ведения технологического процесса производства в целях разработки мероприятий по повышению эффективности производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-4 ПК-1 Использует методы проведения расчетов для проектирования производств биотехнологической продукции для пищевой промышленности, технологических линий, цехов, отдельных участков организаций с использованием систем автоматизированного проектирования и программного обеспечения, информационных технологий при создании проектов вновь строящихся и реконструкции действующих организаций.

ИД-5 ПК-1 Проводит основные технологические процессы производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

ИД-6 ПК-1 Осуществляет учет сырья и готовой продукции на базе стандартных и сертификационных испытаний производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности в целях обеспечения нормативов выхода готовой продукции в соответствии с технологическими инструкциями.

ИД-7 ПК-1 Учитывает показатели эффективности технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

Контрольные вопросы:

1. Химическое исследование питательных сред.
2. Отличительные признаки и цветные реакции альбумоз и пептонов.
3. Качественное исследование питательных сред.
4. Колориметрический метод определения содержания пептонов.
5. Испытание качества пептона (по схеме Кашинцевской биофабрики):
6. Биуретовая реакция;
7. На хлориды;
8. На тяжелые металлы;
9. На зольность;
10. На содержание влаги;
11. На свободный индол;
12. На цистиновую группу.
13. Определение азота белков по Топштейн (100);
14. Ксаптонпротеиновая реакция.
15. Реакция на свободный триптофан.
16. Определение степени чистоты продажного пептона.

Теоретическая часть.

Химическое исследование питательных сред.

Различные серии сред, изготовленные даже по одному и тому же рецепту, обладают различными питательными качествами. При изготовлении сред разведение перевара обычно определяют по количеству взятых для изготовления исходных продуктов (мяса, дрожжей и т. д.) без учета качества полученной мясной воды, перевара или пептона. Колебания химического состава питательных сред, несомненно, отражаются на интенсивности роста бактерий, токсинообразовании и пр. Для приготовления однородных питательных сред необходим химический контроль как за режимом гидролиза, так и за конечными продуктами (готовые питательные среды). Надо сказать,

что этот раздел нельзя считать достаточно разработанным. В то же время сейчас представляется достаточно ясным, что каждая категория сред имеет свой химический состав. Лишь учитывая суммарные данные биохимических показателей и продуктивности среды, дают ей полноценный паспорт. Мы приводим наиболее распространенные методики.

Таблица 1. Отличительные признаки и цветные реакции альбумоз и пептонов

	Альбумозы		Пептоны
	первичные	вторичные	
Растворимость в воде при высоких температурах	Растворяются и не свертывается	Растворяются только в присутствии небольшого количества нейтральных солей	Растворяются и не свертываются
Нагревание в слегка подкисленной уксуснокислой среде	Нет свертывания	Нет свертывания	Нет свертывания
Сернокислый аммоний	Осаждение после прибавления равного объема насыщенного раствора, слегка подкисленного уксусной кислотой	Осаждение при полном насыщении в слегка подкисленном уксусной кислотой растворе	Нет осадка
Азотная кислота	Осадок растворим при нагревании и вновь появляется при охлаждении	Нет осадка	Нет осадка
Железистосинеродистый калий и уксусная кислота	Нет осадка	Нет осадка	Нет осадка
Уксуснокислая медь	Синий осадок	Нет осадка	Нет осадка
Хлористая ртуть	Белый осадок	Белый осадок	Белый осадок
Пикриновая кислота (насыщенный раствор)	Желтый осадок	Желтый осадок	Желтый осадок в концентрированном растворе
Фосфорновольфрамовая кислота в сернокислой среде	Белый осадок	Белый осадок	Белый осадок
Уксусный свинец	Синий осадок	Нет осадка	Нет осадка

Качественное исследование питательных сред

Колориметрический метод определения содержания пептонов. Предварительно готовят колориметрическую шкалу. Для этой цели 0,5 г пептона Витте растирают стеклянной палочкой в химическом стаканчике с 0,5 мл 30% раствора едкого натра и 2—3 мл дистиллированной воды, смывают дистиллированной водой, переводя смесь в мерную колбу, и доводят до 100 мл дистиллированной водой. Из приготовленного таким образом раствора готовят ряд стандартных пробирок по следующей схеме:

Ингредиенты	№ пробирки									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.5 % раствор пептона в мл	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0
Дистиллированная вода в мл	5,8	5,6	5,4	5,2	5,0	4,8	4,6	4,4	4,2	4,0
10 % раствор едкого натра в мл	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1 % раствор медного купороса в каплях	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Обозначение % пептона на стандартной пробирке	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0

Исследуемый перевар или питательный бульон предварительно разводят в 2—10 раз дистиллированной водой, в зависимости от содержания в нем пептона. Для определения в пробирку наливают 1 мл исследуемого перевара или питательного бульона, 1 мл 10% раствора едкого натра, 5 мл дистиллированной воды, 4 капли 1 % раствора медного купороса и сравнивают по цвету на белом фоне или в компараторе Уальполя с пробирками стандартного ряда.

Испытание качества пептона (по схеме Кашинцевской биофабрики):

Биуретовая реакция: При добавлении 5 капель крепкой азотной кислоты к 10 мл профильтрованного прозрачного 1 % раствора пептона не должна образовываться муть, нерастворимая при нагревании до 100 °. К 1 мл 5% раствора пептона добавляют 2 мл 25% раствора едкого натра, смешивают, добавляют 3 капли 5% раствора медного купороса и взбалтывают; раствор дает красно-фиолетовую окраску.

При полном гидролизе белка наблюдают розовое окрашивание (пептоны) при наличии нерасщепленного белка - фиолетовое окрашивание. Биуретовая реакция присуща целой молекуле белка и продуктам его гидролиза (альбумозы, пептоны).

На хлориды: при добавлении к 10 мл 5% раствора пептона двух капель азотной кислоты и 1 мл раствора азотнокислого серебра допускается появление слабой опалесценции.

На тяжелые металлы: 10 мл 5% водного раствора пептона подкисляют 1 мл разбавленной соляной кислоты и прибавляют равный объем свежеприготовленной сероводородной воды; при этом не должно получаться желтого осадка или темного окрашивания жидкости.

На зольность: сжигают 2 г испытуемого пептона до полного озоления; остаток не должен превышать 0,1 г.

На содержание влаги: навеску пептона в 1 г высушивают при 100° до постоянного веса; после последнего взвешивания потеря в весе не должна превышать 0,07 г.

На свободный индол: к 10 мл 5% раствора испытуемого пептона прибавляют 2—3 мл амилового алкоголя, 1 мл азотнокислого калия в разведении 1: 100 и 1 мл химически чистой серной кислоты; не должно получиться розового окрашивания спиртового слоя.

На цистиновую группу: к 5 мл 5 % раствора пептона добавляют 5 мл 16% раствора едкого натра и 5 капель 10% раствора азотнокислого или уксуснокислого свинца и ставят пробирку на кипящую баню на 10 минут, причем происходит потемнение жидкости или выпадает черный осадок.

Определение азота белков по Топштейн (100):

К 25 мл перевара или 2% раствора пептона в мерной колбе на 50 мл добавляют 10 мл раствора буфера с pH = 4,7 и нагревают на кипящей водяной бане. Если при нагревании не наблюдается свертывания белков, то, отметив отсутствие последних, раствор разбавляют по охлаждению водой до метки, взбалтывают и берут 20 мл этого раствора (что соответствует 10 мл исходного раствора) для определения азота альбумоз. Если же при нагревании раствора выпал осадок белка, то, разбавив его по охлаждению водой до метки, фильтруют раствор через сухой фильтр в колбу, отбрасывая первую порцию фильтрата. 2 мл фильтрата (1 мл исходного раствора) сжигают по Кьельдалю и определяют содержание азота; вычтя из общего азота азот фильтрата, находят азот белков.

Ксантонпротеиновая реакция. К 5 мл перевара или питательной среды добавляют 0,5-1 мл азотной кислоты, при этом обычно образуется осадок, который снова растворяется при нагревании (кипятят 2 минуты); жидкость и осадок окрашиваются в желтый цвет. После охлаждения добавляют немного аммиака или едкого натра; цвет раствора вместо желтого становится оранжевым. Реакция основана на содержании в белке бензольного ядра и указывает на присутствие в среде триптофана, тирозина или фенилаланина.

Реакция на свободный триптофан. Разводят исследуемый перевар 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, разливают по 5 мл в пробирки и добавляют в каждую из них несколько капель бромной воды; появление красного окрашивания свидетельствует о наличии триптофана.

Определение степени чистоты продажного пептона.

Проблема химического контроля пептона сложна и в настоящее время не разрешена. Для определения чистоты продажного пептона 5-10 г пептона растворяют в 50 мл воды, подкисляют 2 каплями уксусной кислоты, прибавляют порошкообразный хлористый аммоний до насыщения (остается избыток нерастворимой соли), фильтруют и исследуют жидкость на истинные пептоны при помощи биуретовой реакции. Оставшийся на фильтре осадок промывают в насыщенном растворе хлористого аммония, дают стечь. Жидкость отжимают между листами фильтровальной бумаги и снова растворяют в нескольких мл воды. В этом растворе определяют отличительные признаки первичных и вторичных альбумоз.

Список литературы, рекомендуемый к использованию по данной теме:

Перечень основной литературы:

1. Залашко М.В. Биотехнология переработки молочной сыворотки. М.: В.О. «Агропромиздат». – 1990. – 192 с.
2. Залашко М.В., Залашко Л.С. Микробный синтез на молочной сыворотке. Минск: Наука и техника. –1990. –274 с.
3. Сидоров М.С., Корнелаева Р.П. Микробиология мяса и мясопродуктов. М.: Колос. –1996. –240 с.
4. Тутов И.К., Ситьков В.И. Основы биотехнологии ветеринарных биопрепаратов. Ставрополь: 1997. –253 с.

Перечень дополнительной литературы:

1. Баснакьян И.А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами.. М.: Медицина. –1992. –192 с.
2. Безбородов А.М. Биосинтез биологически активных веществ микроорганизмами. М.: Медицина. –1969. –246 с.
3. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. М.: Медицина. – 1973. – 456 с.
4. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. М.: Изд-во МГУ. -1989. –294 с.
5. Иванов В.Н. Энергетика роста микроорганизмов. Киев: Наукова думка. –1981. – 140 с.
6. Коротяев А.И. Механизмы саморегуляции бактериальной клетки. М.: Медицина. – 1973. –272 с.
7. Козлов Ю.А. Питательные среды в медицинской биологии. М.: МЕДГИЗ – 1950 – 252 с.
8. Месробяну Л., Пуэнеску Э. Физиология бактерий. Бухарест: Меридиане. –1963. – 807 с.
9. Мосичев М.С., Складнев А.А., Котов Б.В. Общая технология микробиологических производств. М.: Легкая и пищевая промышленность. –1982. – 264 с.
10. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир. – 1978. –331 с.

11. Практикум по физико-химическим методам в биологии. М.: Изд-во МГУ. –1981. –240 с.
12. Руководство по вакцинному и сывороточному делу. Под ред. Бургасова П.Н. М.: Медицина. –1978. –440 с.
13. Уэбб Ф. Биохимическая технология и микробиологический синтез. Пер. с англ. Швалева П.Е. М.: Медицина. –1969. –560 с.

Методическая литература:

1. Методические указания к лабораторным работам по дисциплине «Виды, использование и регенерация питательных сред».

Интернет-ресурсы:

1. <http://biblioclub.ru> : [ЭБС «Университетская библиотека ONLINE»];
2. <http://diss.rsl.ru> : [Электронная библиотека диссертаций РГБ];
3. <http://e.lanbook.com> : [ЭБС издательства «Лань»];
4. <http://elibrary.ru> : [Научная электронная библиотека eLIBRARY.RU];
5. <http://uisrussia.msu.ru> : [Университетская информационная система РОССИЯ (УИС РОССИЯ)].

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Методические рекомендации

по организации самостоятельной работы обучающихся
по дисциплине «**Виды, использование и регенерация питательных сред**»
для студентов направления подготовки /специальности
19.03.01 - Биотехнология
Направленность (профиль) Промышленная биотехнология

1. Цель и задачи освоения дисциплины (модуля)

Цель освоения дисциплины: формирование у студентов знаний и навыков приготовления и контроля качества питательных сред в микробиологическом производстве, использование этих знаний при решении биотехнологических задач.

Задачи освоения дисциплины:

- изучение вопросов технологии приготовления питательных сред;
- контроль качества питательных сред;
- обоснование оптимальных вариантов использования биологических объектов в качестве сырья при производстве пищевых продуктов.

2. Место дисциплины (модуля) в структуре образовательной программы

Дисциплина относится к дисциплинам по выбору Б1.В.ДВ.03.01. Её освоение происходит в 6 семестре.

3. Перечень планируемых результатов обучения по дисциплине (модулю), соотнесённых с планируемыми результатами освоения образовательной программы

Код, формулировка компетенции	Код, формулировка индикатора	Планируемые результаты обучения по дисциплине (модулю), характеризующие этапы формирования компетенций, индикаторов
ПК-1 – способность участвовать в разработке и проектировании технологических процессов согласно принятой в организации технологии производства пищевой и биотехнологической продукции с использованием современных систем автоматизированного проектирования	ИД-1 ПК-1 Имеет представление о технологии производства и организации производственных и технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности	Осуществлять контроль качества питательных сред стандартными методиками на основе принятой в отрасли технической документации.
	ИД-2 ПК-1 Имеет представление об основе технологии производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности	Осуществлять технологический процесс приготовления питательных сред на основе принятой в отрасли технической документации.
	ИД-3 ПК-1 Может осуществлять входной и технологический контроль качества сырья, полуфабрикатов и готовой продукции для организации рационального ведения технологического процесса производства в целях разработки мероприятий по повышению эффективности производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности	Осуществлять выбор оптимальных вариантов использования биологических объектов в качестве сырья при производстве пищевых продуктов.
	ИД-4 ПК-1 Использует методы проведения расчетов для проектирования производств биотехнологической продукции для пищевой промышленности, технологических линий, цехов, отдельных участков	Разрабатывать новую техническую документацию на основе принятой в организации технологии производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности.

	организаций с использованием систем автоматизированного проектирования и программного обеспечения, информационных технологий при создании проектов вновь строящихся и реконструкции действующих организаций	
	ИД-5 ПК-1 Проводит основные технологические процессы производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности	Осуществлять первичный документооборот и учёт отчетности при производстве биотехнологической продукции для пищевой промышленности.
	ИД-6 ПК-1 Осуществляет учет сырья и готовой продукции на базе стандартных и сертификационных испытаний производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности в целях обеспечения нормативов выхода готовой продукции в соответствии с технологическими инструкциями	Осуществлять учет сырья и готовой продукции на базе стандартных и сертификационных испытаний производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности в целях обеспечения нормативов выхода готовой продукции в соответствии с технологическими инструкциями
	ИД-7 ПК-1 Учитывает показатели эффективности технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности	Учитывать показатели эффективности технологических процессов производства биотехнологической продукции для пищевой промышленности

5.5 Технологическая карта самостоятельной работы обучающегося

Коды реализуемых компетенций	Вид деятельности студентов	Итоговый продукт самостоятельной работы	Средства и технологии оценки	Объём часов, в том числе (астр)		
				СРС	Контактная работа с преподавателем	Всего
6 семестр						
ПК-1	Подготовка к лабораторным работам	Отчет по лабораторной работе	Собеседование	6	30	36
ПК-1	Самостоятельное изучение литературы	Презентация	Собеседование	6	30	36
ПК-1	Подготовка к зачёту	Зачёт	Вопросы к зачёту	6	30	36
Итого за 6 семестр				18	90	108
Итого				18	90	108

6. Фонд оценочных средств для проведения текущего контроля успеваемости и промежуточной аттестации обучающихся по дисциплине (модулю)

Фонд оценочных средств (ФОС) для проведения текущего контроля успеваемости и промежуточной аттестации обучающихся по дисциплине *Общая биология и микробиология* базируется на перечне осваиваемых компетенций с указанием этапов их формирования в процессе освоения дисциплины (модуля). ФОС обеспечивает объективный контроль достижения запланированных результатов обучения. ФОС включает в себя:

- описание показателей и критериев оценивания компетенций на различных этапах их формирования, описание шкал оценивания;
- методические материалы, определяющие процедуры оценивания знаний, умений, навыков и (или) опыта деятельности, характеризующих этапы формирования компетенций;
- типовые контрольные задания и иные материалы, необходимые для оценки знаний, умений и уровня овладения формируемыми компетенциями в процессе освоения дисциплины (модуля).

ФОС является приложением к данной программе дисциплины (модуля).

7. Методические указания для обучающихся по освоению дисциплины

Приступая к работе, каждый студент должен принимать во внимание следующие положения.

Дисциплина (модуль) построена по тематическому принципу, каждая тема представляет собой логически завершённый раздел.

Лекционный материал посвящён рассмотрению ключевых, базовых положений курсов и разъяснению учебных заданий, выносимых на самостоятельную работу студентов *(включается при наличии соответствующих занятий)*.

Практические занятия проводятся с целью закрепления усвоенной информации, приобретения навыков ее применения при решении практических задач в соответствующей предметной области *(включается при наличии соответствующих занятий)*.

Лабораторные работы направлены на приобретение опыта практической работы в соответствующей предметной области *(включается при наличии соответствующих занятий)*.

Самостоятельная работа студентов направлена на самостоятельное изучение дополнительного материала, подготовку к практическим и лабораторным занятиям, а также выполнения всех видов самостоятельной работы.

Для успешного освоения дисциплины, необходимо выполнить все виды самостоятельной работы, используя рекомендуемые источники информации.

8. Учебно-методическое и информационное обеспечение дисциплины

8.1. Перечень основной и дополнительной литературы, необходимой для освоения дисциплины (модуля)

8.1.1. Перечень основной литературы:

1. Залашко М.В. Биотехнология переработки молочной сыворотки. М.: В.О. «Агропромиздат». – 1990. – 192 с.
2. Залашко М.В., Залашко Л.С. Микробный синтез на молочной сыворотке. Минск: Наука и техника. –1990. –274 с.
3. Сидоров М.С., Корнелаева Р.П. Микробиология мяса и мясопродуктов. М.: Колос. –1996. –240 с.
4. Тутов И.К., Ситьков В.И. Основы биотехнологии ветеринарных биопрепаратов. Ставрополь: 1997. –253 с.

8.1.2. Перечень дополнительной литературы:

1. Баснакьян И.А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами.. М.: Медицина. –1992. –192 с.
 2. Безбородов А.М. Биосинтез биологически активных веществ микроорганизмами. М.: Медицина. –1969. –246 с.
 3. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. М.: Медицина. – 1973. – 456 с.
 4. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. М.: Изд-во МГУ. -1989. –294 с.
 5. Иванов В.Н. Энергетика роста микроорганизмов. Киев: Наукова думка. –1981. – 140 с.
 6. Коротяев А.И. Механизмы саморегуляции бактериальной клетки. М.: Медицина. – 1973. –272 с.
 7. Козлов Ю.А. Питательные среды в медицинской биологии. М.: МЕДГИЗ – 1950 – 252 с.
 8. Месробяну Л., Пуэнеску Э. Физиология бактерий. Бухарест: Меридиане. –1963. – 807 с.
 9. Мосичев М.С., Складнев А.А., Котов Б.В. Общая технология микробиологических производств. М.: Легкая и пищевая промышленность. –1982. – 264 с.
 10. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир. – 1978. –331 с.
 11. Практикум по физико-химическим методам в биологии. М.: Изд-во МГУ. –1981. –240 с.
 12. Руководство по вакцинному и сывороточному делу. Под ред. Бургасова П.Н. М.: Медицина. –1978. –440 с.
 13. Уэбб Ф. Биохимическая технология и микробиологический синтез. Пер. с англ. Швалева П.Е. М.: Медицина. –1969. –560 с.
- 8.2. Перечень учебно-методического обеспечения самостоятельной работы обучающихся по дисциплине (модулю)
1. Андрусенко, С. Ф. Разработка оптимальных методов регенерации полужидкой питательной среды / С. Ф. Андрусенко, И. В. Бегдай // Микробиология и биотехнология. — 2019. — № 3. — С. 45–52.
 2. Андрусенко, С. Ф. Оптимизация методов регенерации питательной среды Блаурока / С. Ф. Андрусенко, Е. В. Денисова // Биотехнология. — 2020. — № 4. — С. 67–73.
 3. Лабинская, А. С. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований : учебное пособие / А. С. Лабинская, Л. П. Блинкова, А. С. Ещина. — Москва : Медицина, 2004. — 576 с. — ISBN 5-225-04250-7.
 4. Галиуллин, А. К. Основы лабораторного дела : учебное пособие / А. К. Галиуллин, Д. Н. Мингалеев, Ф. М. Нургалиев. — Казань : КГАВМ, 2015. — 128 с.
 5. Методические рекомендации по изготовлению и использованию питательных сред и растворов для микробиологических целей, культивирования клеток и вирусов. — Москва, 2018. — 48 с.
 6. Методы контроля бактериологических питательных сред : МУК 4.2.2316-08. — Москва : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008. — 32 с.
- 8.3. Перечень ресурсов информационно-телекоммуникационной сети «Интернет», необходимых для освоения дисциплины (модуля)
1. ГОСТ ISO 11133-2016. Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред [Электронный ресурс]. — URL: <https://normativ.kontur.ru/document?moduleId=9&documentId=479469> (дата обращения: 01.04.2026).

2. ГОСТ Р 70393-2022. Изделия медицинские для диагностики in vitro. Приготовление, производство, хранение и испытания питательных сред [Электронный ресурс]. — URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200193718> (дата обращения: 01.04.2026).

9. Перечень информационных технологий, используемых при осуществлении образовательного процесса по дисциплине (модулю), включая перечень программного обеспечения и информационных справочных систем

При чтении лекций используется компьютерная техника, демонстрации презентационных мультимедийных материалов. На семинарских и практических занятиях студенты представляют презентации, подготовленные ими в часы самостоятельной работы.

Информационные справочные системы:

Информационно-справочные и информационно-правовые системы, используемые при изучении дисциплины:

1	http://biblioclub.ru - ЭБС «Университетская библиотека ОНЛАЙН»
2	http://www.iprbookshop.ru - ЭБС IPRbooks

Программное обеспечение:

1	- Операционная система: Microsoft Windows 8 (версия 8.1.) договор 01-эа/13 от 25.02.2013, срок действия лицензии: бессрочный.
2	- Офисные приложения: Microsoft Office Standard 2013, договор 01-эа/13 от 25.02.2013, срок действия лицензии: бессрочный.

10. Описание материально-технической базы, необходимой для осуществления образовательного процесса по дисциплине (модулю)

Лекционные занятия		Учебная аудитория для проведения занятий лекционного типа, укомплектованная специализированной мебелью и техническими средствами обучения, служащими для представления учебной информации: компьютер (переносной ноутбук), проектор (переносной проектор), доска магнитно-маркерная. Учебно-наглядные пособия в виде тематических презентаций, соответствующих рабочим программам дисциплин.
		Фонды и ресурсы Научной библиотеки СКФУ
Лабораторные занятия		Учебная аудитория для проведения занятий лабораторного типа, укомплектованная специализированной мебелью и техническими средствами обучения, служащими для представления учебной информации: компьютер (переносной ноутбук), проектор (переносной проектор), доска магнитно-маркерная.
		Фонды и ресурсы Научной библиотеки СКФУ
Практические занятия		Учебная аудитория для проведения занятий семинарского типа, укомплектованная специализированной мебелью и техническими средствами обучения, служащими для представления учебной информации: компьютер (переносной ноутбук), проектор (переносной проектор), доска магнитно-маркерная.
		Фонды и ресурсы Научной библиотеки СКФУ
Самостоятельная работа		Помещения для самостоятельной работы, оснащенные компьютерной техникой с возможностью подключения к сети «Интернет» и обеспечением доступа в электронную информационно-образовательную среду организации.
		Фонды и ресурсы Научной библиотеки СКФУ

Учебные аудитории для проведения учебных занятий, оснащены оборудованием и техническими средствами обучения. Помещения для самостоятельной работы обучающихся, оснащенные компьютерной техникой с возможностью подключения к сети "Интернет" и обеспечением доступа к электронной информационно-образовательной среде. Специализированная мебель и технические средства обучения, служащие для представления учебной информации.

Материально-техническая база обеспечивает проведение всех видов дисциплинарной и междисциплинарной подготовки, лабораторной, научно-исследовательской работы обучающихся (переносной ноутбук, переносной проектор, компьютеры с необходимым программным обеспечением и выходом в интернет).

Помещения для самостоятельной работы обучающихся оснащены компьютерной техникой с возможностью подключения к сети «Интернет» и обеспечением доступа в электронную информационно-образовательную среду образовательной организации.

11. Особенности освоения дисциплины (модуля) лицами с ограниченными возможностями здоровья

Обучающимся с ограниченными возможностями здоровья предоставляются специальные учебники, учебные пособия и дидактические материалы, специальные технические средства обучения коллективного и индивидуального пользования, услуги ассистента (помощника), оказывающего обучающимся необходимую техническую помощь, а также услуги сурдопереводчиков и тифлосурдопереводчиков.

Освоение дисциплины (модуля) обучающимися с ограниченными возможностями здоровья может быть организовано совместно с другими обучающимися, а также в отдельных группах.

Освоение дисциплины (модуля) обучающимися с ограниченными возможностями здоровья осуществляется с учетом особенностей психофизического развития, индивидуальных возможностей и состояния здоровья.

В целях доступности получения высшего образования по образовательной программе лицами с ограниченными возможностями здоровья при освоении дисциплины (модуля) обеспечивается:

1) для лиц с ограниченными возможностями здоровья по зрению:

- присутствие ассистента, оказывающий студенту необходимую техническую помощь с учетом индивидуальных особенностей (помогает занять рабочее место, передвигаться, прочитать и оформить задание, в том числе, записывая под диктовку),
- письменные задания, а также инструкции о порядке их выполнения оформляются увеличенным шрифтом,
- специальные учебники, учебные пособия и дидактические материалы (имеющие крупный шрифт или аудиофайлы),
- индивидуальное равномерное освещение не менее 300 люкс,
- при необходимости студенту для выполнения задания предоставляется увеличивающее устройство;

2) для лиц с ограниченными возможностями здоровья по слуху:

- присутствие ассистента, оказывающий студенту необходимую техническую помощь с учетом индивидуальных особенностей (помогает занять рабочее место, передвигаться, прочитать и оформить задание, в том числе, записывая под диктовку),
- обеспечивается наличие звукоусиливающей аппаратуры коллективного пользования, при необходимости обучающемуся предоставляется звукоусиливающая аппаратура индивидуального пользования;
- обеспечивается надлежащими звуковыми средствами воспроизведения информации;

3) для лиц с ограниченными возможностями здоровья, имеющих нарушения опорно-двигательного аппарата (в том числе с тяжелыми нарушениями двигательных функций верхних конечностей или отсутствием верхних конечностей):

- письменные задания выполняются на компьютере со специализированным программным обеспечением или надиктовываются ассистенту;
- по желанию студента задания могут выполняться в устной форме.