

Лабораторне заняття № 7-8

ТЕМА: «Процеси бродіння. Типи бродіння: спиртове, молочнокисле, пропіоновокисле, муравьинокислий, маслянокислосе, ацетоно-бутилове, гомоацетатное; мікроорганізми, здатні до бродіння і їх використання в промисловості»

МЕТА: знати визначення і види бродіння, особливості бродіння у еукаріот і прокаріот; вміти працювати, виділяти і вирощувати мікроорганізми, здатні до бродіння; визначати продукти бродіння при культивуванні продуцентів - етиловий спирт, молочну, масляну, оцтову кислоти і ін.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ:

1. Види бродіння, баланс реакцій бродіння і їх механізм.
2. Освіта етанолу дріжджами.
3. Види бродіння по Нейберга.
4. Освіта етанолу бактеріями.
5. Ефект Пастера.
6. Гомо- і гетероферментативних молочнокисле бродіння.
7. Особливості маслянокислого бродіння.
8. Пропіоновокисле бродіння.
9. Характеристика мікроорганізмів, здатних до бродіння.
10. Застосування дріжджів і молочнокислих бактерій.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА:

Залежно від умов середовища безазотистих органічні речовини розкладаються аеробними або анаеробними мікроорганізмами. Кінцевими продуктами розпаду вуглеводних сполук аеробних мікроорганізмів є вуглекислий газ і вода, анаеробних - продукти неповного розкладання (кислоти, спирти, ін.). від основного продукту, що утворюється при перетворенні безазотистих органічних речовин, в першу чергу вуглеводів, ці процеси отримали назву: маслянокислого, спиртового, молочнокислого бродіння.

Перетворення цукру до молочної кислоти (переважно) отримало назву молочнокисле бродіння. Збудники цього процесу - молочнокислі бактерії - дуже поширені в природі. Їх можна знайти всюди: в повітрі, воді, ґрунті, на поверхні овочів, фруктів, в першу чергу, в молоці, кишечнику людини і тварин і ін.

За характером бродіння молочнокислі бактерії ділять на дві групи: гомоферментативное, що утворюють при зброджуванні основний продукт молочну кислоту, і гетероферментативні, які, крім молочної кислоти, утворюють цілий ряд інших продуктів: оцтову і бурштинову кислоти, спирт, вуглекислий газ, ін. Розкладання вуглеводів мікроорганізмами з утворенням

масляної кислоти та інших продуктів отримало назву маслянокислого бродіння. Типовими збудниками даного виду бродіння є маслянокислі бактерії роду *Clostridium*. Це палички з перетріхальним розташуванням джгутиків в молодому віці. З розвитком вони втрачають джгутики, набувають веретеноподібну форму (завдяки кластрідіальному розташуванню суперечка) і накопичують в клітинах гранульози, яка з йодом дає синє забарвлення.

Маслянокислі бактерії - облигатні анаероби, спороносні, хемоорганотрофні, дуже чутливі до кислотності середовища (оптимальна величина рН 7,0-7,3).

Маслянокисле бродіння має велике значення, так як його збудники беруть участь в процесах мінералізації органічних відходів в ґрунті, фіксують азот повітря, використовуються в промисловості для виробництва масляної кислоти. Однак маслянокисле бродіння може завдавати і значної шкоди, обумовлюючи гниття картоплі. Овочів і фруктів, силосу, псування сиру, масла, консервів та ін.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА:

Завдання № 1. Вивчення молочнокислих мікроорганізмів

Для мікроскопічного вивчення молочнокислих бактерій готують препарат з кислого молока. Бактеріологічну петлю вводять в згусток і, повернувши навколо осі, витягають, торкаючись нею до плівки. Згусток розмазують на предметному склі дуже тонким шаром без води. Сушать на повітрі. Фіксують сумішшю Никифорова (спирт з ефіром у співвідношенні 1:1) протягом 10 хв. Фіксований препарат фарбують по Граму (або метиленовим синім).

На препаратах, як правило, переважають дрібні округлі клітини *Streptococcus lactis*, з'єднані в короткі ланцюжки. Нерідко на препараті видно тонкі палички роду *Lactobacillus* різних розмірів, іноді містять зерна волотина. Найчастіше зустрічається *Lactobacillus bulgaricus*. Якщо на поверхні кислого молока з'явилася плівка, то в мазку виявляється також і молочна цвіль *Geotrichum candidum* (*Oidium lactis*), яка завжди супроводжує молочнокислого бродіння і є небажаним його супутником. Вона окисляє молочну кислоту, що утворюється молочнокислими бактеріями, до CO_2 і H_2O , і кислотність знижується. В результаті молочнокислі і квашені продукти починають псуватися, так як в середовищі розвиваються гнильні бактерії. Чотирикутні або овальні клітини молочної цвілі відрізняються від молочнокислих бактерій великими розмірами.



Рис. 1 – Схематичне зображення деяких пологів молочнокислих бактерій:
а - *Leuconostoc*; б - *Lactobacillus*

Завдання № 2. Визначення кислотності молочних продуктів

Для визначення кислотності молочних продуктів проводять титрування аналізованої проби: до 10 мл молока додають 20 мл дистильованої води, 1-2 краплі фенолфталеїну і титрують 0,1 н розчином NaOH при постійному збовтуванні до появи стійкої слабо-рожевого забарвлення.

Кислотність молока висловлюють або у відсотках молочної кислоти, або в градусах Тернера ($^{\circ}$ T): 1° T відповідає 1 мл 0,1 н лугу, що пішла на титрування 100 мл. Отже, якщо на титрування 10 мл молока пішло X мл лугу, то для вираження кислотності молока в градусах Тернера потрібно X помножити на 10.

Щоб висловити кислотність в процентах молочної кислоти, слід кількість 0,1 н NaOH (в мл), витрачений на титрування 100 мл молока, помножити на 0,009, так як 1 мл 0,1 н NaOH нейтралізує еквівалентну кількість молочної кислоти. Молекулярна маса молочної кислоти дорівнює 90. Для приготування 1 мл 0,1 н розчину потрібно 90 г кислоти. В 1 л 0,1 н розчину міститься 9 г, а в 1 мл - 0,009 г молочної кислоти.

Завдання № 3. Виділення маслянокислих мікроорганізмів

Нанесіть краплю кип'яченого молока на предметне скло, додайте розчин Люголя і накрийте покривним склом. При мікроскопірованні препарату виявляються клітини *Clostridium butyricum*, *C. pasteurianum* - рухливі палички з кластрідіальном або плектрідіальним типом

спорообрання. В їх клітинах можна помітити овальні тільця, сильно заломлюють світло. Це суперечки. Характерна особливість маслянокислих бактерій - здатність накопичувати в клітинах гранулози в період спорування. У тих клітинах, де міститься гранулаза, з'являється синьо-фіолетове забарвлення. Замалюйте тільки пофарбовані клітини, які відносяться до групи маслянокислих бактерій.

Завдання № 4. Визначення масляної кислоти

Якісна реакція на масляну кислоту. До 3-5 мл культуральної рідини маслянокислих бактерій в пробірці додайте 0,5 мл 96% -го етилового спирту і 1-2 мл концентрованої сірчаної кислоти. При збовтуванні і нагріванні з'являється характерний запах ефіру (запах ананаса).

ЛІТЕРАТУРА:

Основна література:

1. Лысак В.В. Микробиология: Учебное пособие для студентов биологических специальностей. – Мн.: БГМУ, 2005. – 261 с.
2. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія. – К.: НУХТ, 2004. – 471 с.
3. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підруч. – 2-е вид., доп. і перероб. – К.: НУХТ, 2010. – 632 с.
4. Промышленная микробиология / Под ред.. Н.С. Егорова. – М. Высш.шк., 1989. – 688 с.
5. Шлегель Г.Г. Общая микробиология. М.: Мир, 1987. – 567 с.

Інформаційні ресурси:

6. biotech.nuph.edu.ua
7. http://www.labprice.ua/ukrainski_naukovi_tovarisiva/tovarisiva_mikrobiologiv_ukraini_im_sm_vinogradskogo_tmu
8. <http://www.antibiotic.ru/index.php>
9. <http://collegemicrob.narod.ru/microbiology/>
10. http://www.allvet.ru/knowledge_base/microbiology/mikrobiologiya.php
11. <http://www.grandars.ru/college/medicina/mikrobiologiya.html>
12. <http://mikrobiki.ru/>