

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ГОРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Кафедра биологической и химической технологий

Хозиев А.М. , Цуткиева В.Б. , Рамонова Э.В.

ПРОИЗВОДСТВО ДРОЖЖЕЙ

Учебно-методическое пособие
по дисциплине «Производство дрожжей»
для студентов, обучающихся по направлению подготовки
19.03.01 – «Биотехнология»
очной и заочной форм обучения

Квалификация – бакалавр

Владикавказ, 2019

Составители:

к.с.-х.н., доцент кафедры биологической и химической технологий ФГБОУ ВО Горский ГАУ **Хозиев А.М.**,

д.с. -х.н., заведующая кафедрой технологии производства, хранения и переработки продуктов растениеводства ФГБОУ ВО Горский ГАУ **Цугкиева В.Б.**,

к.б.н., доцент кафедры биологической и химической технологий ФГБОУ ВО Горский ГАУ **Рамонова Э.В.**

Рецензент – *Кабисов Р.Г.*, д.б.н., доцент кафедры стандартизации и сертификации факультета биотехнологии и стандартизации Горского государственного аграрного университета

Хозиев А.М., Цугкиева В.Б., Рамонова Э.В. Производство дрожжей / Учебно-методическое пособие / А.М. Хозиев, В.Б. Цугкиева, Э.В. Рамонова. – Владикавказ: Издательство ФГБОУ ВО «Горский госагроуниверситет», 2019, – 224с.

Учебно-методическое пособие предназначено для подготовки к лекционным и лабораторным занятиям по дисциплине «Производство дрожжей». Учебно-методическое пособие предназначено для самостоятельной и аудиторной работы студентов.

Учебно-методическое пособие рассмотрено на заседании методического совета факультета биотехнологии и стандартизации Горского ГАУ (протокол № 2 от 28 сентября 2018 года) и заседании методической комиссии Горского ГАУ (протокол № 1 от 27 ноября 2018 г.).

© Издательство ФГБОУ ВО
«Горский госагроуниверситет», 2019

ВВЕДЕНИЕ	7
ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	9
Тема 1. Возникновение и развитие дрожжевого производства	9
1.1. История развития науки о дрожжах	9
1.2. Распространение дрожжевых грибов в природе	12
1.3. Возникновение и развитие дрожжевого производства ...	15
1.4. Технологические этапы производства дрожжей	21
Тема 2. Основные и вспомогательные материалы дрожжевого производства	24
2.1. Свеклосахарная меласса как основное сырье для дрожжевого производства	24
2.2. Показатели состава мелассы, соответствующей требованиям дрожжевого процесса. Вредные примеси мелассы	28
2.3. Основные материалы	31
2.4. Вспомогательные материалы	34
Тема 3. Подготовка мелассы для производства хлебопекарных дрожжей	39
3.1. Доставка и хранение мелассы	39
3.2. Подготовка питательной среды	41
3.3. Рассиропка мелассы	43
3.4. Подготовка растворов питательных солей	43
3.5. Способы осветления мелассы	44
Тема 4. Биологические особенности дрожжей – сахаромикетов, применяемых в дрожжевом производстве	48
4.1. Признаки, используемые в систематике дрожжей	48
4.2. Способы хранения чистых культур дрожжей	52
4.3. Расы дрожжей	53
4.4. Строение дрожжевой клетки	55
4.5. Особенности метаболизма дрожжей	56
Тема 5. Состав дрожжей	59
5.1. Химический состав дрожжей	59
5.2. Ферменты дрожжей	60
5.3. Витамины дрожжей	65
5.4. Жиры и углеводы дрожжей	67
Тема 6. Скорость роста дрожжей и факторы, влияющие на неё	70
6.1. Скорость роста дрожжей на мелассовых средах	70

6.2. Влияние физико-химических факторов на рост и развитие дрожжей	71
6.3. Выход дрожжей	74
Тема 7. Производство дрожжей различными способами	76
7.1. Производство дрожжей периодическими способами	76
7.2. Производство дрожжей непрерывными способами	82
7.3. Аппаратурно-технологическая схема производства дрожжей	84
7.4. Требования ГОСТ Р54731-2011 к качеству прессованных хлебопекарных дрожжей	87
Тема 8. Выделение дрожжей	89
8.1. Отделение дрожжей от бражки и промывание	89
8.2. Прессование дрожжей	91
8.3. Формование и упаковка дрожжей	94
8.4. Сушка дрожжей	96
Тема 9. Кормовые дрожжи	101
9.1. Характеристика кормовых дрожжей	101
9.2. Технология производства кормовых дрожжей	107
ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	127
Тема 1. Техника безопасности при работе в производственной лаборатории	127
Тема 2. Биологические особенности дрожжей сахаромикетов	135
2.1. Изучение правил работы с микроскопом	135
2.2. Методы исследования микроорганизмов в светлом микроскопе	136
Тема 3. Питательные среды для дрожжей	143
3.1. Изучение состава питательных сред, используемых для культивирования дрожжей сахаромикетов	143
3.2. Методы стерилизации питательных сред	145
Тема 4. Изучение морфологии дрожжей	147
4.1. Микропипетирование дрожжей	147
4.2. Измерение клетки хлебных, винных или пивных дрожжей (сравнить и зарисовать)	148
Тема 5. Получение элективной культуры дрожжей	151
5.1. Элективные среды для дрожжей	151
5.2. Выделение чистой культуры дрожжей	153
Тема 6. Методы определения сухих веществ мелассы	156
6.1. Правила взятия проб мелассы	156

6.2. Определение сухих веществ мелассы	156
6.3. Определение активной кислотности (рН) мелассы	157
Тема 7. Определение состава сахаров мелассы	159
7.1. Определение содержания сахарозы методом прямой поляризации	159
7.2. Определение инверсионной поляризации	160
7.3. Определение содержания инвертного сахара методом Офнера	161
7.4. Расчет сахаристости (суммы сбраживаемых сахаров) ..	162
Тема 8. Определение доброкачественности и содержание азота в мелассе	164
8.1. Определение доброкачественности	164
8.2. Определение содержания общего азота	165
8.3. Определение аминного азота «медным способом» ...	166
8.4. Определение усвояемого азота (формольное число) ...	167
Тема 9. Анализ золы мелассы	169
9.1. Определение содержания золы в мелассе	169
9.2. Определение содержания калия при сухом озолении ...	170
9.3. Ускоренный метод определения калия кобальт-нитритом натрия в азотнокислой среде (ВНИИХП)	172
9.4. Определение суммы солей кальция и магния	173
9.5. Определение содержания магния	174
Тема 10. Методы определения цветности мелассы, буферности мелассы и расхода серной кислоты для осветления мелассы	176
10.1. Определение цветности мелассы	176
10.2. Определение буферности мелассы	177
10.3. Определение расхода серной кислоты для осветления мелассы	178
Тема 11. Определение содержания летучих кислот	179
11.1. Определение содержания летучих кислот методом отгонки с водяным паром	179
11.2. Определение содержания сернистого ангидрида	180
Тема 12. Сушка дрожжей	183
12.1. Сушка дрожжей в шахтной сушилке ВИС-42Д	183
12.2. Сушка дрожжей в виброкипящем слое	185
12.3. Сушка дрожжей под вакуумом	185
12.4. Сушка методом сублимации	186
Тема 13. Кислотность и осмоустойчивость дрожжей	188
13.1. Определение осмоустойчивости дрожжей	188
13.2. Определение кислотности дрожжей	188

Тема 14. Основные показатели процесса культивирования дрожжей..	190
14.1. Технологические характеристики установки БИОЛУК-3Ш	190
14.2. Принцип действия установки БИОЛУК-3Ш	191
14.3. Влияние активной кислотности среды	192
14.4. Влияние концентрации сухих веществ на рост и развитие дрожжей	192
14.5. Влияние температуры на процесс культивирования дрожжей	193
Тема 15. Анализ готовой продукции	195
15.1. Правила приемки дрожжей	195
15.2. Отбор проб и определение влажности дрожжей	195
Тема 16. Количественный учет дрожжей	198
16.1. Методы количественного учета дрожжей	198
16.2. Подсчет клеток в счетных камерах	200
16.3. Комплексный подсчет клеток в счетных камерах	202
16.4. Подсчет клеток в фиксированных окрашенных препаратах (метод Виноградского-Брида)	203
16.5. Методы посева на питательные среды	204
16.6. Определение биомассы взвешиванием	208
Тема 17. Расчет основных технологических показателей	209
17.1. Расчет материального баланса	209
17.2. Материальный баланс	210
17.3. Рекомендации по выполнению расчета основных технологических показателей.....	213
Тема 18. Санитарная обработка оборудования на предприятиях дрожжевого производства	214
18.1. Санитарная обработка при производстве хлебопекарных дрожжей	214
18.2. Дезинфекция оборудования для производства кормовых дрожжей	217
Список рекомендуемой литературы	220
Глоссарий	222

ВВЕДЕНИЕ

Данное учебно-методическое пособие предназначено для изучения дисциплины «Производство дрожжей» для бакалавров направления подготовки 19.03.01 – Биотехнология. Пособие состоит из двух основных частей: 1 – теоретической и 2 – практической. Теоретическая часть рассчитана на проведение 18 часов аудиторных лекционных занятий, а практическая часть на проведение лабораторных занятий в количестве 36 часов.

Материал, представленный в пособии способствует подготовке специалистов, владеющих теоретическими основами и практическими приемами, используемыми в дрожжевом производстве, ознакомление студентов с основными видами и расами дрожжей, оборудованием, эксплуатируемым в ходе производственного цикла, основами безопасных методов труда. Студент должен изучить современное состояние и перспективы развития дрожжевого производства, типовые приемы и особенности культивирования хлебопекарных и кормовых дрожжей, оборудование, используемое в ходе производственного цикла на всех этапах, вопросы экологической безопасности производства и математические расчеты продуктовых и энергобалансов.

Компетенции обучающегося, формируемые в результате освоения материала, изложенного в данном учебно-методическом пособии:

а) общекультурными (ОК): способностью использовать основы экономических знаний в различных сферах деятельности (ОК–3), способностью к самоорганизации и самообразованию (ОК–7);

б) общепрофессиональными компетенциями: способностью и готовностью использовать основные законы естественнонаучных дисциплин в профессиональной деятельности, применять методы математического анализа и моделирования, теоретического и экспериментального исследования (ОПК–2);

в) профессиональными компетенциями, соответствующими виду (видам) профессиональной деятельности, на который (которые) ориентирована программа бакалавриата: производственно–технологическая деятельность:

– способностью осуществлять технологический процесс в соответствии с регламентом и использовать технические средства для измерения основных параметров биотехнологических процессов, свойств сырья и продукции (ПК–1), способностью к реализации и управлению биотехнологическими процессами (ПК–2), способностью систематизировать и обобщать информацию по использованию ресурсов предприятия (ПК–7), способностью проводить стандартные и сертификационные испытания сырья, готовой продукции и технологических процессов (ПК–9).

В теоретической части пособия представлены следующие темы: «Возникновение и развитие дрожжевого производства», «Основные и вспомогательные материалы дрожжевого производства», «Подготовка мелассы для производства хлебопекарных дрожжей», «Биологические особенности дрожжей – сахаромицетов, применяемых в дрожжевом производстве», «Химический состав дрожжей», «Скорость роста дрожжей и факторы, влияющие на неё», «Производство дрожжей различными способами», «Выделение дрожжей», «Кормовые дрожжи».

Практическая часть содержит руководство по следующим темам лабораторных занятий: «Техника безопасности при работе в производственной лаборатории», «Биологические особенности дрожжей сахаромицетов», «Питательные среды для дрожжей», «Изучение морфологии дрожжей», «Получение элективной культуры дрожжей», «Методы определения сухих веществ мелассы», «Определение состава сахаров мелассы», «Определение доброкачественности и содержание азота в мелассе», «Анализ золы мелассы», «Методы определения цветности мелассы, буферности мелассы и расхода серной кислоты для осветления мелассы», «Определение содержания летучих кислот», «Способы высушивания дрожжей», «Кислотность и осмоустойчивость дрожжей», «Основные показатели процесса культивирования дрожжей», «Анализ готовой продукции», «Количественный учет дрожжей», «Расчет основных технологических показателей», «Санитарная обработка оборудования».

Изучение всех тем заканчивается вопросами для самоконтроля, которые позволяют студентам закрепить полученные во время работы с данным пособием знания по дисциплине «Производство дрожжей».

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Тема 1. Возникновение и развитие дрожжевого производства

- 1.1. История развития науки о дрожжах.
- 1.2. Распространение дрожжевых грибов в природе.
- 1.3. Возникновение и развитие дрожжевого производства.
- 1.4. Технологические этапы производства дрожжей.

1.1. История развития науки о дрожжах

Первыми живыми организмами, которые человек использовал для удовлетворения своих потребностей, явились дрожжи благодаря уникальной способности к спиртовому брожению. Первое упоминание о получении спиртных напитков в Египте, так называемой «бузы», представляющей собой разновидность пива, относится к 6000 г. до н.э. Этот напиток получали в результате сбраживания пасты, полученной при раздавливании и растирании проросшего ячменя. Приготовление бузы можно считать рождением современного пивоварения. Из Египта технология пивоварения была завезена в Грецию, а оттуда в Древний Рим. В этих же странах активно развивалось виноделие. Крепкие спиртные напитки, полученные перегонкой бражки, по-видимому, были впервые получены в Китае около 1000 г. до н.э. В Европе процесс производства спирта был завезен значительно позже. Известно, что получение виски было налажено в Ирландии в XII в. Сейчас промышленное производство спиртных напитков существует в большинстве стран мира и представляет собой крупную отрасль промышленности.

Историю тесного общения человека со своими постоянными одноклеточными микроскопическими спутниками – дрожжами, можно условно разделить на отдельные периоды.

Первый период начинается с XX века до нашей эры и до 18 века н.э. Человек сумел «приручить» дрожжи, даже не зная об их существовании. Дрожжи работали на человека, производя различные бод-

рящие напитки, содержащие этиловый спирт. Напиток, напоминающий современное пиво («буза»), был известен уже в Древнем Египте. Там же возник способ приготовления хлеба из кислого дрожжевого теста. Это стало ясно после того, как в раскопках храма и гробниц фараона Эхнатона и его супруги – легендарной Нефертити, живших во второй половине XIV века до нашей эры, археологи натолкнулись на скопление форм для выпечки хлеба и кувшинов для пивоварения. В Китае уже в X веке до нашей эры умели отгонять спирт из дрожжевой бражки для получения крепких спиртных напитков. Европейцы пристрастились к спиртному несколько позже: производство виски началось в Ирландии в XI веке, а в XIII веке в Европе широко распространилось пивоварение. Венцом этого периода можно считать первое описание дрожжей, которые в 1680 г. увидел в капле броющего пива под микроскопом голландец Антонии Ван Левенгук. Хотя он и не связал процесс образования пива с жизнью этих мельчайших «анималькулей», но его рисунки до сих пор поражают точностью изображения дрожжевой клетки. После этого ничего нового о дрожжах не появлялось целых 150 лет.

Второй период занимает весь XIX век, начиная с 30-х годов. Это период зарождения научных знаний о дрожжах, когда были сделаны первые научные описания дрожжей (Каньяр де Латур во Франции, Теодор Шванн и Фридрих Кютцинг в Германии), способов их размножения, спорообразования, жизненных циклов. Именно в этот период дрожжи были названы сахарными грибами – *Saccharomyces*. Важнейшим событием этого периода было исследование Луи Пастером в 1860–1876 гг. спиртового брожения и доказательство его биохимической природы. В 1881 г. Эмилем Хансенем в Дании были впервые получены чистые культуры дрожжей. Использование чистых культур преобразило виноделие и пивоварение, превратив их из вида искусства в крупную отрасль промышленности. Исследования братьев Бюхнер в Германии (1890-е гг.) по сбраживанию сахара бесклеточными экстрактами дрожжей положили начало развитию энзимологии и биохимии. В самом конце XIX в. Хансенем и Клекером в Дании была создана первая классификация дрожжей.

Третий период охватывает время с начала XX века до настоящего времени. Оно характеризуется дифференциацией научных направлений в области изучения дрожжей. В первой четверти прошлого века создается эволюционно-филогенетическое направление в си-

стематике дрожжей (А. Гийермон во Франции, 1909–1928 гг.), организуется первая коллекция дрожжевых культур. С 1931 г. началось издание серии определителей дрожжей в Дельфте (Голландия). В 1954 г. вышел первый отечественный определитель дрожжей В.И. Кудрявцева.

Открытие радиационного мутагенеза Г.А. Надсоном и С.Г. Филипповым в 1925 г. заложило основы радиобиологии и стимулировало исследования по генетике дрожжей. Они касались доказательств существования чередования поколений в жизненном цикле дрожжей с изменением пloidности. Было показано, что аскоспоры *Saccharomyces cerevisiae* гаплоидны, и конъюгация спор или их потомков приводит к восстановлению диплоидного состояния, характерного для вегетативной стадии сахаромисетов. О. Винге разработал метод тетрадного анализа с изоляцией 4 спор аска с помощью микроманипулятора. Впоследствии дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* оказались прекрасным модельным объектом для генетических исследований, и со времени этих работ генетика дрожжей развивалась очень бурно. Были выполнены тысячи работ как теоретического, так и прикладного характера, касающиеся конструирования генетически измененных штаммов дрожжей для биотехнологической промышленности.

Вторая половина XX в. отличается еще большей дифференциацией разделов зимологии, выделением новых направлений. Возникают функциональная морфология и цитология дрожжей (В.И. Бирюзова в СССР, Матиль в Швейцарии, Е. Штрейблова в Чехословакии), молекулярная генетика и генетическая систематика (работы японских, американских, канадских ученых, в СССР – исследования Г.И. Намумова), морская зимология (А.Е. Крисс, М.И. Новожилова в СССР), экология и закономерности распределения дрожжей. Появляются новые отрасли на стыке разных направлений, растут запросы и потребности биотехнологии, широко использующей дрожжевые организмы в самых разных производствах. Дрожжи все больше вовлекаются в работы по созданию векторных систем для получения ценных продуктов биологического синтеза.

Существенно изменились представления о разнообразии дрожжей и подходы к их классификации. Неуклонно растет число известных видов дрожжевых грибов, периодически издаются определители, среди которых мировую известность получила серия определителей

голландской школы – крупных сводок с описанием всех известных видов дрожжей. Редакторами выходящих с интервалом 10–15 лет изданий этого определителя были крупнейшие зимологи Дж. Лоддер, Н. Креггер Ван Рий, Дж. Фелл, Х. П. Куртцман. Начиная с 80-х гг. периодически переиздается еще один определитель, под редакцией Дж. Барнетта, основанный на использовании компьютерных технологий идентификации. В нашей стране исследования в области систематики дрожжей связаны в основном с именами И.П. Бабьевой, В.И. Голубева, Г.И. Наумова.

Особенно сильное влияние на изучение дрожжей, также как и большинства других групп микроорганизмов, оказало бурное развитие в конце XX в. молекулярной биологии. В современной систематике дрожжей широко используются методы геносистематики, основанные на непосредственном сравнении геномов и секвенировании нуклеотидных последовательностей. Применение единых молекулярно-биологических методов позволило еще больше сблизить подходы к таксономии дрожжевых и мицелиальных грибов, установить связи между дрожжевыми анаморфами и мицелиальными телеоморфами, разработать новые критерии для создания единой филогенетической системы всего царства *Mycota*. В то же время, новые знания породили и новые научные проблемы, в частности, проблему соотношения новейших молекулярных методов с традиционными, основанными на морфологических и физиологических подходах к изучению дрожжей. Практически полностью расшифрован геном *Saccharomyces cerevisiae*, что открывает огромные перспективы геномики дрожжей, новые горизонты их биотехнологического использования. Таким образом, наука о дрожжах, проделав более чем полуторавековой путь, продолжает интенсивно развиваться и в XXI веке.

1.2. Распространение дрожжевых грибов в природе

Особенности распространения дрожжей в природе стали интересовать микробиологов начиная с самых первых исследований процессов традиционного виноделия. Первоначально изучение дрожжей ограничивалось теми видами и штаммами, которые вызывали брожение при приготовлении пива и вина. Однако уже в конце XIX в. М. Бейеринк высказывал мысль о том, что эти культурные виды представляют собой селекционированные формы «диких» дрожжей, ши-

роко распространенных в природе. Естественно, возник вопрос об источниках их попадания в бродящие субстраты. Первые исследования, выполненные основателями зимологии Э. Хансеном и А. Клекером, были посвящены именно этой теме: поиску природных источников винных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. В нашей стране этому вопросу также уделяли внимание крупнейшие микробиологи, например, Г.А. Надсон. Сахаромицеты были найдены на ягодах винограда, однако, как оказалось, преобладают здесь совсем иные виды дрожжей, не участвующие в последующем сбраживании виноградного сока. Еще реже встречались сахаромицеты в окружающих субстратах, в частности, в почве под виноградниками. Уже в ранних работах высказывалось предположение, что почва не является средой, в которой возможно активное развитие дрожжевых грибов, а служит для последних лишь своеобразной «ловушкой», где дрожжи могут сохраняться определенное время в жизнеспособном состоянии и служить источником спор для инфицирования винограда нового урожая. Таким образом, возникло понятие «круговорота дрожжей» в природе.

Под «дрожжами» в то время подразумевались одноклеточные аскомицетовые грибы, родственные сахаромицетам и способные к активному брожению. Расширяющиеся микологические исследования приводили к обнаружению все новых видов дрожжевых грибов, в том числе и таких, которые существенно отличались от типичных сахаромицетов. Оказалось, что многие из одноклеточных грибов, выделяемых из природных источников, не образовывали аскоспор и вообще не были способны к сбраживанию сахаров. Для таких дрожжей была создана серия формальных родов (*Torulopsis*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*), виды которых часто обнаруживаются в самых различных природных субстратах, включая почву, растения, разнообразные растительные остатки и природные воды. Стало понятным, что дрожжи распространены довольно широко, и их развитие далеко не ограничивается субстратами традиционных бродильных процессов. Однако, при этом существенно изменилось и содержание самого понятия «дрожжи». Дрожжами стали называть любые одноклеточные грибы, не обязательно вызывающие спиртовое брожение. В то же время, несмотря на существенные отличия между сахаромицетами и небродящими дрожжевыми грибами, достаточно долго сохранялось представление о дрожжах как самостоятельной

филогенетической линии грибов. Лишь после обнаружения у несовершенных дрожжей рода *Rhodotorula* полного жизненного цикла, типичного для телиоспоровых гетеробазидиомицетов, термин «дрожжи» окончательно утратил таксономическое содержание. Тем не менее, вплоть до настоящего времени, дрожжи продолжают рассматриваться в качестве единой группы, представляющей собой особую жизненную форму, или экоморфу грибов. Дело в том, что все дрожжи обладают очень сходным обликом за счет роста преимущественно в виде одиночных клеток. Кроме того, с одноклеточной организацией дрожжей сопряжены многие их физиологические особенности, в частности, узкий спектр усваиваемых соединений, отсутствие способности к гидролизу труднодоступных полимеров, особенно таких, как целлюлоза и лигнин, быстрый рост за счет потребления простых углеводов. Особенно характерен этот набор признаков для аскомицетовых дрожжей. Все это делает их более приспособленными к обитанию в жидких и мелкодисперсных средах, богатых легкодоступными источниками углерода, в то время как мицелиальные грибы получают преимущество при росте на плотных поверхностях. Одноклеточность у грибов – вторичное явление в их эволюции, которое возникало независимо в разных группах аско- и базидиомицетов, как реакция на существование в жидких и полужидких средах с относительно высокой концентрацией легкодоступных источников питания. Вскоре после открытия Пастером дрожжевой природы спиртового брожения было показано, что дрожжи постоянно обитают на поверхности ягод винограда и других сладких плодов, в цветочном нектаре, в кишечнике многих ксилофагов, проложенных ими галереях и личиночных камерах, в измельченной древесине, в кишечниках самых разных беспозвоночных, на наземных частях растений, в почве и т.д.

По-новому следует оценивать роль дрожжей в природных экосистемах. Например, считавшиеся долго безвредными комменсалами многие эпифитные дрожжи, обильно обсеменяющие зеленые части растений, могут оказаться не такими уж «невинными», если учесть, что они представляют собой лишь гаплоидную стадию в жизненном цикле организмов, близко родственных фитопатогенным головневым или ржавчинным грибам. И, наоборот, патогенные для человека дрожжи, вызывающие опасные и трудноизлечимые болезни – кандидоз и криптококкоз – в природе имеют сапротрофную стадию и легко выделяются из мертвых органических субстратов. Из этих примеров

видно, что для понимания экологических функций дрожжей необходимо изучение полных жизненных циклов каждого вида. Обнаружены и почвенные дрожжи с особыми функциями, важными для образования почвенной структуры. Неисчерпаемы по многообразию и связи дрожжей с животными, особенно с беспозвоночными.

1.3. Возникновение и развитие дрожжевого производства

На заре технологических взаимоотношений человека с дрожжевыми грибами все попытки получения продукции носили случайный характер, так как не хватало достаточных знаний о природе и закономерностях процессов брожения.

Новый этап в развитии бродильных процессов начался после работ Пастера, Коха и других корифеев микробиологии, которые ввели в практику метод чистых культур. Тем не менее, до конца XIX в. дрожжи применялись лишь в виноделии, пивоварении и хлебопечении.

Раньше дрожжи для хлебопечения получали с пивоварен. В конце XIX в. развилась целая отрасль по производству прессованных или сухих пекарских дрожжей. Современное производство пекарских дрожжей имеет ряд существенных особенностей по сравнению с бродильной промышленностью. Основная цель такого производства – получение дрожжей, которые с высокой скоростью вырабатывают в тесте углекислый газ за счет брожения в анаэробных условиях. Однако производить их надо при хорошей аэрации, чтобы добиться большего выхода дрожжевой биомассы (эффект Пастера). Полученные дрожжи должны не только обладать высокой бродильной активностью в тесте, но и хорошо храниться, не теряя своих качеств в замороженном или высушенном состоянии. Пекарские дрожжи выращивают в больших сосудах при интенсивном перемешивании и аэрации. При этом питательная среда, основой которой обычно служит меласса, подается постепенно, или порциями. Если добавить сразу много сахара, то метаболизм дрожжей переключится на бродильный (эффект Кребтри) и выход биомассы уменьшится.

С 18 в. пивные дрожжи стали широко применяться в хлебопечении, и слава о них как об энергичном разрыхлителе хлебного теста, распространилась по всему миру. Пивные осадки представляли собой дрожжи верхового брожения. О видах и расах дрожжей ничего не было известно, лишь благодаря Левенгуку в 17 в. с помощью мик-

роскопа стало возможным увидеть и описать дрожжевую клетку. Гораздо позднее, с усовершенствованием микроскопа и появлением методов выделения чистых культур микроорганизмов, появилась возможность более реального исследования дрожжей. При производстве пива, вина или спирта дрожжи создавались как побочный продукт. Большинству семей, которые варили пиво только раз в году, было необходимо учиться хранить дрожжи. Их хранили под пивом или водой, внимательно следя за температурой, или сушили.

В 1850 году был открыт способ производства прессованных дрожжей для хлебопечения: это были дрожжи, получаемые на винокурных заводах. Дрожжи, содержащиеся в пене, из бродильных чанов по жалобам, размещенным вдоль чанов, поступали в дрожжевые сборники. Затем их промывали, смешивая с холодной водой в отстойниках, и полученный осадок впрессовывали на винтовых пресах. Первый завод, выпускавший наряду со спиртом и хлебопекарные дрожжи, возник в середине 19 в. в Вене. Венский способ производства дрожжей быстро распространился. Таким образом, в начале 1860-х годов к издавна существовавшим биохимическим производствам: пивоваренному, спиртовому, винодельческому, основанным на действии дрожжей, прибавилась еще одна биохимическая отрасль промышленности – дрожжевое производство, в то время как на названных предприятиях дрожжи были лишь средством для получения определенной продукции.

По венскому способу дрожжи получали наряду со спиртом, и преобладающим продуктом производства был спирт, а не дрожжи. В связи с этим заводы, работавшие по венскому способу, назывались спиртодрожжевыми. Венский способ по существу представлял собой лишь некоторое видоизменение способов получения спирта. Первоначально выход дрожжей, получаемых по венскому способу, составлял 9–10% и спирта около 30% к массе сырья, затраченного на затор.

Постепенно венский способ совершенствовался. Появилось необходимое оборудование: просеивательные машины для удаления дробилы, смешанной со снятыми дрожжами, поворотная коленчатая труба в отстойном чане для спуска промывной воды с дрожжей, фильтр-пресс, формовочная машина, оросительный холодильник для охлаждения счерпываемых дрожжей и пр.

В 1870-х гг. благодаря работам Пастера стало известно о стимулирующем влиянии атмосферного кислорода на размножение дрожжей, а начиная с 1878 г. это наблюдение Пастера пытались применить на практике дрожжевого производства. Однако, еще долгое время не удавалось применить кислород воздуха для ускорения роста дрожжей. Только в 1886 г. был предложен новый способ производства прессованных дрожжей, предусматривающий применение фильтрованного сусла и продувание воздухом. Принцип работы по новому способу получил название «воздушный», а в 1890-х гг. был пущен первый дрожжевой завод, работающий по этому способу.

Заводы, продолжавшие работать по венскому способу, увеличили выход дрожжей до 16–18% при помощи продувания воздухом во время брожения в течение 6–8 часов.

Сырьем, как и при венском способе, служили зерновые культуры. В то время еще не были изобретены дрожжевые сепараторы, и для выделения дрожжей все содержимое бродильного чана переливали в плоские железные или деревянные чаны, где дрожжи отстаивались (оседали) на дно чана в течение 12 часов. Затем с них сливали бражку и направляли ее на брагоперегонные аппараты для отгонки спирта. При этом из 100 кг сырья получали от 18 до 20 кг дрожжей и от 20 до 22 л спирта. Качество дрожжей было неудовлетворительное: они характеризовались малой стойкостью, недостаточной подъемной силой и быстро темнели на воздухе. Воздушный способ внедрялся в промышленность очень медленно, с течением времени он был усовершенствован. Однако, значительных успехов удалось достичь только в 1900 г., когда выпущены первые дрожжевые сепараторы и стало возможным выделять дрожжи без отстаивания. Стоимость дрожжевых сепараторов быстро окупалась благодаря тому, что с их помощью дрожжи из бражки извлекались полностью. Кроме того, при сепарировании, которое производится с большой быстротой, нет необходимости предварительно охлаждать всю бражку до 18–20°C, как это делалось прежде до передачи ее в отстойные чаны. При использовании сепараторов охлаждали лишь дрожжевое молоко, объем которого составлял около 15–20% первоначального объема бражки. Таким образом, значительно уменьшился расход воды, затрачиваемый на охлаждение. За счет усовершенствования технологических режимов выход дрожжей повысился до 30–40% (теоретический выход биомассы дрожжей с содержанием влаги 75 % находит-

ся в пределах 96,6–116,8 масс. % от массы мелассы, содержащей 46 масс. % сахара. В заводских условиях выход дрожжей составляет 68–92 %).

В начале 20 в. дрожжевое производство подверглось коренному изменению. Выход дрожжей из единицы сырья еще больше увеличился, а выход спирта снизился до такого уровня, при котором его отгонка экономически уже не оправдывалась. Дорогое зерновое сырье было заменено отходами свеклосахарного производства, кормовой патокой-мелассой, из которой после соответствующей обработки получали мелассовое сусло.

Недостающие питательные соли добавляли в строгом соответствии с потребностью всей массы дрожжей. Новый способ вошел в практику под названием «приточного». Развилось дрожжевое производство, в ходе которого была прекращена одновременная выработка спирта, и термин «дрожжеспиртовой завод» лишился придатка «спиртовой».

Таким образом, с 1916 г. за рубежом возникли дрожжевые заводы, вырабатывающие исключительно хлебопекарные дрожжи из отходов сахарного производства свекловичной мелассы.

Первые дрожжевые заводы России были построены в городах: Курске (1862), Москве (1870), Киеве (1872), Петербурге (1873). В их числе были специализированные «дрожжевые заведения» по выработке прессованных пивных дрожжей.

В годы послевоенных пятилеток разрушенные заводы были восстановлены и развернулось строительство новых. Новые заводы, оснащенные отечественным и импортным оборудованием, были построены в городах: Воронеже, Красноярске, Узловой (Тульская область), Петровске, Куйбышеве, Нижнем Тагиле, Краматорске, Тбилиси, Эркен-Шахаре (Ставропольский край).

Производство хлебопекарных дрожжей было организовано так же на ряде спиртовых заводах путем использования послеспиртовых дрожжей-сахаромецетов.

В середине 20 в. технология дрожжевого производства подверглась существенному изменению. Этому способствовали успехи в области биологии и биохимии, которые позволили теоретически обосновать новые технологические режимы выращивания дрожжей на мелассовых растворах с использованием сахаров среды на накопление дрожжевой массы и полным подавлением спиртового брожения в аэрируемой среде.

Усилия, приложенные на первых фабриках по производству дрожжей, позволили существенно улучшить качество хлебопекарных дрожжей, адаптировать их к нуждам хлебопеков. Дрожжи, выпускавшиеся на промышленных заводах, имели главное достоинство – стабильность качества, так как производились на специализированном оборудовании под контролем опытных специалистов. Основным видом продукции стали прессованные дрожжи с влажностью около 70%, которые могли храниться до нескольких недель. Главным недостатком оставалось то, что длительное хранение дрожжей было по-прежнему невозможно. При хранении клетки прессованных дрожжей сохраняли свою активность, что приводило к их автолизу и гибели, в конечном итоге, к значительному снижению бродильной активности. Одним из способов промышленной консервации дрожжей стало высушивание. В сухих дрожжах при низкой влажности дрожжевая клетка находится в «спящем» состоянии и может сохраняться длительное время. Первые качественные сухие дрожжи стали доступны голландским хлебопекам в 1945 году. Это были сухие дрожжи, которые сейчас известны как «сухие активные дрожжи». Сухие активные дрожжи представляли собой сферические гранулы около 1 мм в диаметре. Для получения этого продукта дрожжевая масса высушивалась в течение от 10 до 20 часов в горизонтальном сушильном аппарате до влажности 7–8%. С появлением этого вида дрожжей исчезла острота проблемы хранения. Этот продукт производился в основном на экспорт. Главный недостаток сухих активных дрожжей выражен в потере значительной части активности в процессе сушки. Причиной этого является неблагоприятный режим сушки, в ходе которого происходит разрушение значительного количества дрожжевых клеток, которые находятся в наружном слое гранулы. Принципиально новый режим сушки был разработан и внедрен «Гист-эн Спиритусфабрик», которая с 1967 года сменила название на «Гист-брокадес» («Gist-brocades»). В 1972 году появилось второе поколение сухих дрожжей – инстантные дрожжи. Технология инстантных дрожжей заключалась в использовании специального метода быстрой сушки без повреждения клеточной мембраны и консервации дрожжей вакуумом. Сушка дрожжевой культуры осуществляется в горячем воздушном потоке, конечная влажность продукта составляет 4%. Время сушки сократилось до 20 минут. Первые инстантные были названы Fermipan.

Третье поколение сухих дрожжей возникло на стыке микробиологии и энзимологии. С давних времен люди знали о полезных свойствах ферментов в хлебопечении. Только совсем недавно стало возможным объединить достоинства инстантных дрожжей с полезными свойствами хлебопекарных ферментов.

Благодаря успешному завершению изысканий в области конструкции дрожжерастительных аппаратов и аэрационных устройств, способных быстро поставлять дрожжам растворенный кислород, необходимый для активации их роста и размножения. Возникла возможность коренного технологического переворота предприятий дрожжевой промышленности. За счет увеличения количества дрожжей, накапливающихся в 1 м³ среды, повысился съём их с единицы емкостей дрожжерастительных аппаратов. Были разработаны новые конструкции дрожжерастительных аппаратов и аэрационных устройств. Одновременно была усовершенствована и технология дрожжевого производства: вместо малопродуктивных периодических схем выращивания дрожжей в практику дрожжевых заводов были широко внедрены удлиненные технологические схемы с выращиванием дрожжей в мелассовых растворах двойной концентрации; вместо разбавления мелассы в пропорции 1:30 с успехом была применена переработка концентрированных заторов с разбавлением мелассы в пропорции 1:15. В связи с этим резко возросла производительность дрожжевых заводов и выход дрожжей. За последние годы дрожжевые предприятия с успехом осваивают эффективный воздушно-приточный метод культивирования дрожжей в непрерывном потоке питательной среды. Одновременно были внедрены высокопроизводительные кларификаторы, сепараторы, диспергаторы для аэрации среды, вакуум-фильтры для выпрессовывания дрожжей. Все это позволило повысить выход дрожжей свыше 90% в расчете на мелассу.

Кроме того, сейчас разрабатываются и внедряются новые технологические способы и приемы, позволяющие не только увеличивать производительность предприятий, но и улучшать качество выпускаемой продукции, экономить воду и др. материалы.

Большое внимание в промышленности уделяется получению новых рас и штаммов дрожжей. ВНИИХП-ом в содружестве с Академией наук России селекционированы для промышленности новые, более урожайные расы и штаммы дрожжей, обогащенные провитамином D-эргостерином. Они устойчивы к повышенному осмотическо-

му давлению, высокой температуре и т.д. Появились новые работы в области исследования тепло- и массообменных процессов, протекающих при выращивании дрожжей, что повлекло за собой создание новых дрожжерастительных аппаратов, сушилок и другого оборудования.

Современная технология производства дрожжей состоит из комплекса сложных физико-химических, биохимических, теплоэнергетических и микробиологических процессов, осуществляемых посредством различных аппаратурных схем. Технолог не может эффективно руководить процессом, не имея о нем необходимых данных в каждый текущий момент времени. Получать эти данные позволяют средства автоматического контроля и автоматизированного управления.

1.4. Технологические этапы производства дрожжей

Основными стадиями производства хлебопекарных дрожжей являются: приготовление питательной среды; многоступенчатое размножение (выращивание) посевных дрожжей; выращивание товарных дрожжей; выделение из жидкой среды, формование, упаковка и охлаждение или сушка прессованных дрожжей.

В процессе выращивания дрожжей из одной клетки получают несколько тонн продукта.

В связи с большим объемом производства выращивание культуры производят многоступенчато. Первые три стадии размножения дрожжей производят в лаборатории, затем три стадии размножения производят в цехе чистой культуры. При выращивании посевных дрожжей необходима высокая стерильность.

Начальная стадия выращивания проходит в микробиологической лаборатории. Прежде всего, с помощью микроскопа отбирается здоровая и невредимая клетка хлебопекарных дрожжей. Выбранную клетку помещают в стерильную пробирку, в которой уже находятся все необходимые для роста клетки ингредиенты (солодовое сусло). В пробирке клетка начинает размножаться почкованием. Когда количество размножившихся клеток достигнет определенной массы, их переносят в стерильную стеклянную колбу. Колба содержит жидкую смесь, называемую питательной средой. В этой среде есть все необходимое для дальнейшего роста клеток.

Содержимое колбы с дрожжевыми клетками переливают в простерилизованные чаны для брожения. В них готовят намного боль-

ше питательной среды, что даст возможность дрожжевым клеткам размножаться дальше. Основным питанием для дрожжей становится меласса, в качестве источника углеводов, добавляют также витамины и минеральные вещества. Меласса поставляется с сахарных заводов. Меласса – это побочный продукт сахарной промышленности.

Мелассу, для использования ее в качестве питательной среды, очищают от нежелательных веществ (осветляют) и добавляют необходимые для жизнедеятельности микроорганизмов компоненты. Осветление мелассы может быть холодным и горячим.

Горячее осветление проводят в случае сильного инфицирования мелассы и при подготовке суслу для начальных стадий размножения дрожжей, требующих повышенной стерильности. Мелассу растворяют в горячей воде, раствор нагревают до 105–108°C, выдерживают 15–60 с, охлаждают до температуры 80–85°C и сепарируют. При очистке раствора центрифугированием из него удаляют вещества, ухудшающие цвет и качество дрожжей.

Азот- и фосфорсодержащие соли целесообразно добавлять в питательную среду непосредственно при выращивании дрожжей, отдельно от мелассного суслу. Растворы солей (10–12%) готовят в отдельном для каждой соли сборнике.

В качестве ростостимулирующего вещества в питательную среду добавляют кукурузный экстракт (6 масс. % от массы мелассы), который предварительно стерилизуют, нагревая после разбавления водой (1 : 1) до кипения. После охлаждения к нему добавляют 5–10 масс. % от массы экстракта биомидина.

Растущие и размножающиеся клетки поступают по очереди в бродильные чаны с все большим объемом. Объем последнего в технологическом процессе бродильного чана – 100–120 м³. В конце брожения количество дрожжей измеряется тоннами.

После процесса брожения дрожжевые клетки промываются и отделяются от питательных веществ с помощью сепараторов. Получается чистая и активная довольно густая дрожжевая масса (дрожжевое молоко).

Затем дрожжевые клетки отделяют от лишней воды и фильтруют на вакуум-фильтре. Полученную дрожжевую массу фасуют и упаковывают для покупателей в предусмотренную упаковку с помощью специальных упаковочных автоматов. Упакованные дрожжи помещают в большие холодильники и остужают до +4°C. При этой темпе-

ратуре прекращаются все физиологические процессы в клетке – и она «засыпает». Это дает возможность долго сохранять живой организм – дрожжевую клетку и ее функциональную активность.

Вопросы

1. Опишите основные этапы развития науки о дрожжах.
2. Кто и когда впервые описал и зарисовал дрожжевые грибы?
3. Кем и когда была доказана роль дрожжевых грибов в спиртовом брожении?
4. Где распространены дрожжевые грибы, и какова их роль в окружающей среде?
5. Как проявляется эффект Пастера?
6. Как проявляется эффект Кребтри?
7. Когда и где был основан первый дрожжевой завод?
8. Из каких технологических этапов состоит дрожжевое производство?

Тема 2. Основные и вспомогательные материалы дрожжевого производства

- 2.1. Свеклосахарная меласса как основное сырье для дрожжевого производства.
- 2.2. Показатели состава мелассы, соответствующей требованиям дрожжевого процесса. Вредные примеси мелассы.
- 2.3. Основные материалы.
- 2.4. Вспомогательные материалы.

2.1. Свеклосахарная меласса как основное сырье для дрожжевого производства

В настоящее время почти 100% мировой продукции пекарских дрожжей получают из мелассы – отхода свеклосахарного производства. В некоторых странах Америки и Европы для производства пекарных дрожжей используют тростниковую мелассу.

Меласса представляет собой концентрированный раствор углеводов, минеральных и органических компонентов. Меласса не содержит всех компонентов, которые необходимы для выращивания с выходом 100% в пересчете на сырье. При культивировании дрожжей на сусле, приготовленном из мелассы, в него добавляют компоненты азотистого, фосфорного, минерального питания, ростовые вещества и др. вспомогательные материалы.

Состав мелассы непостоянен, не всякая меласса пригодна для производства дрожжей. Качество мелассы складывается под влиянием следующих факторов: метеорологических и климатических условий вегетации свеклы; применяемых удобрений; зрелости свеклы и времени уборки (незрелая свекла дает сильно пенящиеся мелассы неполноценного химического состава); условий хранения и состояния свеклы (меласса, полученная после переработки мерзлой и гнилой свеклы, непригодна для производства дрожжей); технологии сахароварения; соблюдения санитарной дисциплины на сахарном заводе (последнее сильно сказывается на обсемененности мелассы); периода сахароварения (полноценными являются мелассы осен-

ней переработки – октябрь, ноябрь по мере удлинения сезона качество мелассы снижается); условий хранения и транспортировки мелассы (чистота хранилищ, трубопроводов, транспортных средств, защита от попадания атмосферных осадков).

Различают мелассу 4-х типов:

- 1) зеленая, получаемая при выработке сахара-сырца;
- 2) белая, получаемая при пропарке в центрифугах желтых кристаллов сахара-сырца;
- 3) рафинадная, получаемая при производстве сахара рафинада;
- 4) остаточная, получаемая при извлечении сахара из мелассы стронциевым методом.

Свекловичная меласса представляет собой темно-коричневого цвета сиропобразный продукт с относительной плотностью около 1,4 и содержанием в нем 73–80% сухих веществ. Данный сироп получают после кристаллизации сахара, дальнейшая выработка которого экономически не выгодна.

Одним из основных показателей характеризующих пригодность этого сиропа для дрожжевого производства является доброкачественность мелассы. Доброкачественность это отношение количества сахара к сухим веществам: $D = \frac{CAX}{C.B}$. Доброкачественность мелассы должна находиться в пределах от 55 до 65%. Меласса доброкачественностью выше 65% представляет собой кристаллизующийся сироп непригодный для дрожжевого производства из-за недостатка зольных элементов, ростовых и органических веществ.

В производстве расходую мелассу учитывают по содержанию в ней сахара. Пробу для определения состава мелассы отбирают из сборника для суточного запаса производственной мелассы или из мелассохранилища, где мелассу смешивают до однородной массы. В отобранной пробе определяют основные показатели качества. На основе полученных данных рассчитывают расход мелассы и питательных солей, а так же расход веществ регуляторов рН среды и веществ – стимуляторов роста дрожжей.

Расход мелассы на каждый затор рассчитывают исходя из фактического содержания сахара в мелассе. В рекомендуемых схемах учитывают расход мелассы с содержанием 46% сахара. Коэффициенты для пересчета: 44–1,45; 45–1,022; 46–1,0; 47–0,98; 48–0,958; 49–0,939.

При оценке степени пригодности мелассы для производства пекарских дрожжей принято изучать состав как сахаров, так и не сахаров мелассы.

Состав мелассы изменяется в широких пределах в зависимости от ряда факторов: климатических и почвенных условий при выращивании свеклы, агрохимических мероприятий, условий хранения свеклы и технологии сахароварения. Химический состав мелассы может изменяться в процессе хранения под воздействием бактериологических и физико-химических процессов.

А) Сахара мелассы. Основной частью мелассы является сахароза $C_{12}H_{22}O_{11}$, количество которой составляет 40–50% иногда до 56%. Кроме сахарозы в мелассе содержится инвертный сахар и раффиноза. Инвертный сахар (смесь глюкозы $C_6H_{12}O_6$ и фруктозы $C_6H_{12}O_6$) частично поступает из свеклы, где его от 0,1 до 0,2%. Содержание инвертного сахара увеличивается в гнилой и мороженой свекле. Значительная часть инвертного сахара образуется в результате гидролитического расщепления в результате сахароварения. Продукты инверсии - глюкоза и фруктоза, снижают количество сахара и ухудшают качество мелассы, т.к. в процессе сахароварения они превращаются в кислоты и красящие вещества.

Раффиноза, находящаяся в свекле, устойчива к высоким температурам и действию щелочей, используемых при производстве сахара, поэтому полностью переходит в мелассу. Содержание раффинозы достигает иногда до 2%. Она представляет собой трисахарид $C_{18}H_{32}O_{16}$, состоящий из галактозы, фруктозы и глюкозы. Раффиноза частично (только на 1/3) используется дрожжами в процессе их роста. Согласно инструкции на поставку мелассы на спиртовые, дрожжевые и другие бродильные производства в мелассе определяют сумму сбраживаемых сахаров. Для этого прямой и инверсионной поляризацией, а так же химическим методом по Офнеру, определяют сумму сбраживаемых сахаров.

Б) Не сахара мелассы. В дрожжевом производстве большое значение имеет состав не сахаров мелассы, которые в своей неорганической части состоят из углекислых, сернокислых, хлористых и азотистых солей калия, натрия, кальция, магния, железа и алюминия, входящих в состав золы. Количество золы в мелассе колеблется в зависимости почвенных и климатических условий выращивания свеклы. В малозольной мелассе (золы мене 7%) питание дрожжей нару-

шается. Наибольший ущерб накоплению дрожжей наносит недостаток калия и магния в среде, так как без них не осуществляется обмен веществ между клеткой и средой.

Очень важно так же соотношение количества золы и сахара. Экспериментально доказано, что на каждые 100 г сахара в мелассе должно приходиться не менее 15 г золы, а лучше 18–20 г.

Органическая часть не сахаров мелассы состоит из двух групп:

- 1) безазотистых;
- 2) азотсодержащих соединений.

К безазотистым соединениям относятся карамели – продукты конденсации углеводов, образовавшиеся в процессе производства сахара под воздействием высоких температур, соли органических кислот и оснований. В мелассе имеются фурфурол, гуминоподобные и ростовые вещества, такие как биотин, инозит, аневрин, рибофлавин, пиридоксин, пантотеновая, никотиновая и фолиевая кислоты. Красящие вещества мелассы состоят из продуктов щелочного распада инвертного сахара – меланоидов и продуктов карамелизации сахара – карамелана. Красящие вещества образуются в процессе сахароварения, и содержание их зависит от технологии этого процесса. В начале сезона сахароварения красящих веществ в мелассе меньше, чем в конце. Меласса с несколько повышенным содержанием красящих веществ может быть переработана в дрожжевом производстве, но показатель цветности не должен превышать 2 мл 0,1 Н раствора йода на 100 мл 2% мелассы. Выход дрожжей при переработке мелассы с цветностью 3–4 мл 0,1 Н раствора йода снижается на 8–10%, при чем, это уменьшение тем сильнее, чем меньше разбавление сырья водой. Готовая продукция получается при этом пониженного качества с плохой подъемной силой и темного цвета. К вредным примесям мелассы кроме красящих веществ относятся летучие кислоты и сернистый ангидрид.

Азотсодержащие вещества состоят из продуктов распада белков – аминокислот, амидов, усваиваемых дрожжами. В мелассе содержится небольшое количество азота в неорганических соединениях. Содержание белкового азота в мелассе так же незначительно. Для дрожжевого производства имеет большое значение количество и состав азотсодержащих веществ в мелассе. В процессе выращивания дрожжей усваивается в основном аминный азот, поэтому проведено большое количество исследований для определения состава

аминокислот в мелассе и степени усвоения их дрожжами. Усвояемый азот раньше определяли опытным путем, однако результаты были не совсем точными, т.к. в мелассе имеется легкоусвояемый дрожжами аминный азот и медленно усвояемый азот аминокислот. В связи с уточнением метода определения аминного азота изменилось понятие о содержании в мелассе азота, усвояемого дрожжами. Количество его при определении медным способом колеблется в пределах от 0,15 до 0,35% к массе мелассы и составляет 15–20% от общего азота.

При переработке незрелой свеклы количество общего и усвояемого азота падает вдвое. При переработке замороженной, а особенно несколько раз оттаявшей, подвергшейся воздействию микроорганизмов, гнилой свеклы, меласса не соответствует требованиям дрожжевого производства. Меласса получается практически без золы и без азота, темного цвета, часто кислая, с большим содержанием солей кальция.

2.2. Показатели состава мелассы, соответствующей требованиям дрожжевого процесса. Вредные примеси мелассы

Мелассу можно разделить на три группы: нормальную, неполноценную и дефектную.

Нормальная меласса соответствует всем основным показателям технических условий на мелассу – сырье для дрожжевого производства – и содержит также все зольные и ростовые вещества, необходимые для выращивания дрожжей.

Неполноценная меласса по основным показателям удовлетворяет требованиям дрожжевого производства в соответствии с техническими условиями, но в ней мало зольных и ростовых веществ. При переработке эту мелассу нормализуют – добавляют недостающие калий, магний и биотин. Дефектная меласса не соответствует требованиям технических условий на мелассу или содержит вредные примеси при нормальных основных показателях ее состава.

Нормальная меласса является хорошим сырьем для производства дрожжей: готовая продукция получается высокого качества, выход высокий; неполноценную мелассу перерабатывают с добавкой недостающих зольных и ростовых веществ.

Дефектная меласса непригодна для дрожжевого производства. Такая меласса редко поступает на дрожжевые заводы: с улучшением условий хранения мелассы на сахарных заводах резко уменьшилось количество бактериальной микрофлоры в мелассе. Обычно меласса содержит не более 2000 микроорганизмов в 1 г, некоторые партии содержат 10–15 тыс. бактерий в 1 г. Лишь к концу сезона производства сахара на дрожжевые заводы поступают инфицированные партии мелассы с содержанием более 50 тыс. микроорганизмов в 1 г.

Дефектная меласса характеризуется следующими признаками: повышенным содержанием сернистого ангидрида, летучих кислот, повышенной цветностью и др.

Небольшие количества сернистого ангидрида – SO_2 (0,01–0,0015%) обнаруживаются при анализе каждого образца мелассы, так как в процессе производства сахара применяется сульфитирование соков при сатурации. Однако встречаются такие партии мелассы, в которых содержатся повышенные количества сернистого ангидрида, что понижает выход дрожжей.

Несмотря на то, что состав мелассы зависит от ряда факторов, ниже приводятся показатели мелассы соответствующей требованиям дрожжевого процесса:

1. Содержание сухих веществ 76–80% по сахарометру.
2. Сахарозы при определении поляриметрическим методом 46–50%.
3. Доброкачественность 55–65%.
4. Инверта 0,5–1,0%.
5. Раффинозы не более 1%.
6. Содержание золы не ниже 7,0%.
7. СаО не более 1%.
8. рН от 6,5–8,5%.
9. Содержание общего азота 1,8–2,0% не ниже 1,4.
10. Цветность 1–2 мл 0,1 Н раствора йода на 100 мл мелассы с содержанием 2% СВ по сахарометру.
11. Количество сернистого ангидрида не более 0,005%.
12. Содержание летучих кислот не более 1,2%.
13. Общее количество микроорганизмов в 1 г мелассы не более 10 тыс., при этом среди них не должно быть активных нитритобразующих бактерий и дрожжей.

14. Биотина не менее 200 мкг на 1 кг мелассы.

15. Число пересевов при биопробе не менее 6.

К вредным примесям мелассы относятся красящие вещества, диоксид серы (сернистый ангидрид), нитриты и летучие кислоты.

Под действием высоких температур в плотных средах сахарного производства происходят реакции меланоидинообразования, щелочно-го разложения и карамелизации сахаров. Образовавшиеся при этом окрашенные продукты полностью переходят в мелассу. Совокупность комплексов красящих веществ относят к группе растворимых коллоидов.

В водном растворе меланоидины и карамели несут положительный заряд и легко адсорбируются несущими отрицательный заряд дрожжевыми клетками, придавая темную окраску готовой продукции.

Продукты щелочного распада инвертного сахара несут отрицательный заряд.

Красящие вещества обладают поверхностной активностью. Содержание их определяется косвенным методом по цветности мелассы.

Нитриты в мелассах обычно не обнаруживают. Они появляются в условиях, благоприятных для развития нитритообразующих бактерий, которые используют кислород нитратов, восстанавливая их до нитритов. Такие условия создаются в приточном мелассном сусле и в культуральных средах дрожжевого производства. В процессе выращивания дрожжей количество нитритов несколько снижается, но их фунгицидное действие сказывается и в ничтожных концентрациях (0,00057%).

При концентрации NO_2 0,0037%, выход дрожжей уменьшается на 8–10%, а при концентрации 0,009–0,002% на 17–21%.

После сульфитации соков и сиропов сахарного производства в мелассу переходит остаточный сернистый ангидрид. Он угнетает жизнедеятельность дрожжей в концентрации 0,0025% (25 мг/л). Нормальной считают мелассу, содержащую не более 0,05% SO_2 , так как при разбавлении ее водой в соотношении 1 : 17 концентрация диоксида серы в среде составит не более 0,0029%, незначительно превышая тормозящий уровень. Однако при работе с более концентрированными средами, например, при разбавлении мелассы в соотношении 1 : 10 – 1 : 12, концентрация SO_2 в среде превысит допустимый предел, вызывая снижение выхода готовой продукции при объективно благополучном показателе содержания SO_2 в мелассе. В такой

ситуации необходимо принимать соответствующие меры, а именно хлорирование мелассы (на каждые 100 г сернистого ангидрида – 100 г активного хлора).

В мелассах обнаружены следующие летучие кислоты (в % мас.):

- уксусная 0,74–1,38;
- изомасляная 0,02–0,06;
- пропионовая 0,011–0,27;
- валериановая 0,02–0,05;
- масляная 0,04–0,24;
- муравьиная 0,11–1,23.

Летучие кислоты, особенно уксусная, муравьиная и масляная, в свободном состоянии угнетают рост дрожжей, находясь в среде в ничтожных концентрациях.

В современных мелассах общее содержание летучих кислот колеблется в пределах 0,5–1,8%. Большая их часть находится в связанном виде – в форме солей, обладающих значительно меньшей токсичностью.

Нормальной считают мелассу, содержащую не более 1,2% летучих кислот.

2.3. Основные материалы

Помимо основного сырья – мелассы, являющейся источником углеводного питания, в дрожжевом производстве применяют ряд химических веществ, являющихся источниками минерального и азотистого питания, источниками ростовых веществ, а так же дезинфицирующие вещества, пеногасители, воздух и вода, называемые вспомогательными материалами.

В культуральную среду для активного роста дрожжей необходимо добавлять азот, фосфор, калий, магний, ростовые вещества, а также питьевую воду и воздух.

Азотистые вещества. При выращивании дрожжей на мелассе важно знать количество в ней азота, усваиваемого растущими клетками количество ростовых и зольных веществ. Меласса, содержащая недостаточное количество азотистых веществ, является неполноценным сырьем для производства дрожжей, критерием оценки пригодности мелассы для производства является содержание легкоусваиваемого азота аминокислот. В мелассе содержится 17 аминокис-

лот, при этом преобладают аспарагиновая и глутаминовая, ускоряющие рост дрожжей.

Сульфаты аммония (сернокислый аммоний) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ используются в дрожжевом производстве, как источник азота. Пригоден медицинский или аккумуляторный сульфат аммония с содержанием азота 20,5%, присутствие фенола не допускается. Это соль белого цвета, легко растворимая в холодной воде. Сульфат аммония – отход производства сернокислого ангидрида, содержит непостоянное количество вредных примесей, тормозящих рост дрожжей (ингибиторы). Сульфат аммония (или сернокислый аммоний) поступает на дрожжевые заводы в мешках, иногда насыпью. Хранят сернокислый аммоний в бункере, по мере надобности он механически подается к подъемнику, откуда на автоматические весы и загружается в чан для растворения.

Аммиак водный технический NH_4OH применяется как источник азота и для регулирования pH среды. В аммиаке первого сорта содержится не менее 25 % азота, а в аммиаке второго сорта не менее 20%. Аммиачная вода поступает на завод в железнодорожных цистернах, из которых её перекачивают в сборники для хранения.

Диаммоний фосфат технический для пищевой промышленности $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ применяют в дрожжевом производстве как источник азота и фосфора. Он содержит фосфорный ангидрид (P_2O_5) не менее 50,5%, аммиак (NH_3) не менее 22,5%. Пригоден диаммоний фосфат марки А и В при условии содержания в нём мышьяка не более 0,005%. Это соль белого цвета, хорошо растворимая в воде, поступает на дрожжевые заводы в мешках и передается на склад. Диммонийфосфат подается к подъемнику, откуда самотеком поступает на автоматические весы и затем в чан для приготовления раствора.

Серная кислота H_2SO_4 применяется для подкисления меласного раствора при осветлении, для регулирования pH культурной среды в процессе выращивания дрожжей и для очистки от бактериальной инфекции засевных дрожжей. В дрожжевом производстве применяют серную кислоту техническую улучшенную (ГОСТ 2184–67) и аккумуляторную (ГОСТ 667–73) с содержанием моногидрата 92,5–94,0%, мышьяка не более 0,0001%.

Ортофосфорная кислота (H_3PO_4) применяется в качестве источника фосфора и как регулятор pH, это бесцветная прозрачная жидкость, содержащая 50,7% P_2O_5 , пригодна термическая ортофосфор-

ная кислота с содержанием мышьяка не более 0,0003%. Ортофосфорная кислота – поступает в железнодорожных цистернах.

Ростовые вещества (биотин). Для нормального развития дрожжей обязательно требуется наличие в среде веществ, стимулирующих накопление биомассы (биотина, инозита и пантотеновой кислоты). Все эти ростовые вещества содержатся в свекловичной меласе в следующих количествах (мкг/кг): инозит 5770000–8000000, пантотеновая кислота 50000–110000, биотин 40–140. При этом количество инозита и пантотеновой кислоты обычно соответствует или несколько превышает то количество, которое необходимо для быстрого накопления биомассы с высоким выходом готовой продукции на единицу сырья. Содержание же биотина даже в мелассах хорошего качества обычно не достигает требуемой нормы (200–250 мкг/кг). Поэтому при оценке пригодности свекловичной мелассы содержание биотина является очень важным показателем.

Содержание биотина в меласе, поступающей на дрожжевые заводы, колеблется в широких пределах – от 40–140 мкг/кг и в среднем составляет 83 мкг/кг, причем партии мелассы с более высоким содержанием биотина (115–140 мкг/кг) встречаются редко. Таким образом, по содержанию биотина свекловичная меласса не удовлетворяет требованиям современного дрожжевого производства.

Дрожжи, выращенные на средах с недостатком биотина, обладают слабой ферментной системой, и поэтому их рост замедляется. Дрожжи, богатые биотином, подготовлены к быстрому размножению, так как биотин облегчает усвоение ими неорганического азота из среды и этим содействует образованию белковых веществ в дрожжевой клетке. Такие дрожжи содержат готовые ферментные системы, активной группой которых является биотин.

В качестве источника биотина в дрожжевом производстве используется кукурузный экстракт, который получают упариванием замоченных вод кукурузы под вакуумом. Экстракт кукурузы характеризуется следующими показателями: по внешнему виду это густая непрозрачная жидкость с хлопьевидной взвесью, либо однородная паста, цвет экстракта от желтого до темно-коричневого, с характерным для кукурузы запахом, содержание С. В. не менее 48%.

Дестибиотин представляет собой белый мелкокристаллический порошок. Используется в качестве источника биотина.

Зольные вещества (калий). Нормализация состава мелассы в результате добавления различных источников биотина вызывает зна-

чительное ускорение роста дрожжей. Однако при переработке некоторых партий мелассы наблюдается понижение стойкости готовой продукции, что происходит от недостаточного содержания калия в мелассе. При этом питание нарушается – в дрожжевую клетку в процессе роста не поступают зольные элементы. А между тем в составе золы дрожжевой клетки калия содержится 23–40%.

Калий может находиться в мелассе не только в свободном, но и в связанном состоянии, поэтому он не весь участвует в обменных реакциях при выращивании дрожжей.

Присутствие ионов калия в мелассной среде требуется для проявления активности многих ферментов, которые участвуют в окислительно-восстановительных реакциях и принимают активное участие в процессе роста и размножения дрожжей.

Из практики работы дрожжевых заводов известно, что на мелассах с низким содержанием калия рост и размножение дрожжевых клеток отклоняется от нормы: замедляются новообразования клеток, появляются дрожжевые клетки с двумя–тремя почками. При этом понижается выработка дрожжей и в конечном итоге сокращается их выход.

Хлорид калия или калий хлористый (технический) KCl применяют как источник калия в случае недостаточного его содержания в золе мелассы. Применяется 1 сорт этого препарата с содержанием хлористого калия не менее 98%.

Карбонат калия, или калий углекислый (поташ) (K_2CO_3) белый порошок, легко растворяется в воде и дает щелочную реакцию, поэтому используется в качестве источника калия и как регулятор pH бродящей жидкости.

Сульфат магния, или мягкий сернокислый ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), легко растворяется в воде. Применяется как источник магния. С этой же целью применяют: хлорид магния или магний хлористый ($MgCl_2 \cdot 7H_2O$) и представляющий собой смесь Mg , CaO и SiO_2 .

2.4. Вспомогательные материалы

Пеногасители используются для гашения пены, которая образуется в процессе культивирования дрожжей в дрожжерастительных аппаратах. Обычно применяют техническую олеиновую кислоту марок А и В, которая содержит не менее 95% жирных кислот и имеет t застывания 10–16 °С.

Нафтеновые кислоты содержатся в нефти, представляют собой ациклические предельные карбоновые кислоты. Внешне маслянистая жидкость темно-коричневого цвета, с водой не смешивается. Рекомендуется для использования при производстве кормовых дрожжей. Масло подсолнечное может применяться для пеногашения в особых случаях, когда на заводе отсутствует олеиновая кислота.

Дезинфицирующие вещества в качестве таковых используют хлорную известь (смесь $CaOCl_2$ и $CaCl_2$), гидроксид натрия технический ($NaOH$), формалин (CH_2O), сода кальцинированная техническая ($CaCl_2$), так же применяют молочную и борную кислоты, перекись водорода, фурацилин, биомицин и биовит.

Хлорная известь применяется для дезинфекции мелассного раствора, аппаратуры и помещений завода. В хлорной извести марки А и В содержится не менее 35% активного хлора.

Гидроксид натрия или сода каустическая выпускается в твердом и жидком видах (концентрация раствора 0,5–1,0%) для мойки и дезинфекции аппаратуры и трубопроводов. Хранить каустическую соду в прохладном закрытом складе.

Сода кальцинированная применяется как средство для мойки аппаратуры и стирки фильтрующих полотен. Содержание Na_2CO_3 59,0%.

Формалин технический – бесцветная прозрачная жидкость, водный раствор формальдегида, при длительном хранении мутнеет вследствие выпадения осадка – парформа. Формалин содержит 37% формальдегида и применяется для дезинфекции трубопроводов, дрожжерастительных аппаратов.

Молочная кислота пищевая $CH_3-CH(OH)-COOH$ представляет собой водный раствор смеси молочной кислоты и ее ангидридов, прозрачная жидкость без мути и осадков. Применяется для подавления деятельности бактерий в засевных дрожжах и вместо серной кислоты для осветления мелассы.

Борная кислота H_3BO_3 кристаллический порошок белого цвета или в виде бесцветных блестящих кристаллов (ГОСТ 9656–75), применяется вместе с молочной кислотой для обработки засевных дрожжей и для подавления микрофлоры мелассного раствора, т.к. смесь указанных кислот обладает большей антибактериальной активностью, чем при использовании каждой в отдельности.

Перекись водорода H_2O_2 представляет собой бесцветную прозрачную жидкость с содержанием 27,5–40% перекиси водорода (ГОСТ 177–71), обладает антибактериальной активностью и применяется для подавления бактерий в засевных дрожжах.

Фурацилин ($C_6H_6N_4O_4$) – зеленовато желтый порошок без запаха. С повышением t растворимость в воде увеличивается. Обладает антибактериальным действием на молочнокислые и споровые бактерии и не влияет отрицательно на дрожжи.

Биомицин (хлоротетрациклин гидрохлорид $C_{22}H_{23}ClN_2O_3HCl$) антибиотик широкого спектра действия и высокой активности, подавляет жизнедеятельность многих микроорганизмов в меласном растворе и кукурузном экстракте.

Биовит представляет собой высушенную массу актиномицета продуцента биомицина, содержащего хлортетрациклин и витамин B_{12} вместе с другими сухими веществами культуральной среды.

Производственная вода и воздух. В дрожжевом производстве вода используется для приготовления питательной среды, для выращивания дрожжей, мытья аппаратуры и помещений, охлаждения среды и дрожжевого молока, а так же для питания паровых котлов. Для указанных целей требуется питьевая вода соответствующая ГОСТу ГОСТ 2874–73.

Вода, поступающая из городской водопроводной сети, считается практически чистой, в ней обнаруживаются только единичные бактерии. Санитарно-гигиеническая оценка воды производится путем определения титра кишечной палочки. Разрешается использовать воду, в которой в 300 мл содержится не более 1 кишечной палочки. Для дрожжевого производства большое значение имеют так же те микроорганизмы, которые могут развиваться по ходу технологического процесса в кислых сахарных средах. Поэтому воду принято оценивать по специально разработанным коэффициентам Вихмана, которые характеризуют степень размножения бактерий воды в стерилизованном сусле в течение 5 суток при $30^\circ C$. Бактерии размножаются тем скорее, чем больше их в используемой воде.

Следует обращать внимание на содержание в воде аммиачных солей, в сущности безвредных в дрожжевом производстве. Но значительное количество аммиака в воде свидетельствует о присутствии микрофлоры, обуславливающей гниение белка растительных и животных остатков, поэтому в такой воде может содержаться ядо-

витый для дрожжей сероводород или азотистая кислота – продукт окисления аммиака. Большое количество в воде азотнокислых солей позволяет предполагать, что вблизи источника водоснабжения происходили или происходят гнилостные процессы.

Большое значение для дрожжевого производства имеет жесткость воды.

Жесткостью воды называют содержание в ней растворимых солей Ca и Mg , выраженное в миллиграмм – эквивалентах на 1 литр воды (1 мг-экв жесткости отвечает содержанию 20,04 мг/л Ca^{++} или 12,16 мг/л Mg^{++}). В зависимости от содержания минеральных солей производственная вода различается по жесткости: весьма мягкая – до 1,5 мг-экв/л;

– мягкая – 1,5–3,0;

– среднежесткая – 3–6;

– жесткая – 6–11;

– повышенной жесткости свыше 11 мг-экв/л.

При выращивании дрожжей требуется мягкая или умеренно жесткая вода. Для мытья заводской аппаратуры и помещений биологически чистая вода, не содержащая микроорганизмы. Для питания паровых котлов непригодна жесткая вода, т.к. она дает накипь, для этого воду умягчают. Для осаждения содержимого дрожжерастительных аппаратов требуется вода возможно низкой t и без механических примесей. Вода в течение суток потребляется неравномерно, в зависимости от графика работы: расход воды на 1 т дрожжей в среднем составляет 150–180 м³.

При выборе площадок под строительство дрожжевых заводов необходимо убедиться в отсутствии химических и бактериальных загрязнений воздуха, особенно со стороны основного направления ветров. В дрожжевом производстве для аэрации используется большое количество воздуха, которое может содержать значительное количество микроорганизмов (до нескольких тысяч в 1 м³). В связи с этим, забор воздуха должен производиться выше конька крыши завода. Воздух необходимо очищать фильтрами и охлаждать. Недостаточная очистка воздуха может явиться причиной обсемененности культуральной жидкости и готовой продукции.

По литературным данным потребность в кислороде (в 1 г O_2 на 1 С.В. дрожжей) составляет: для хлебопекарных дрожжей – 0,86 г; для кормовых дрожжей – 2 г.

Вопросы

1. Опишите основные свойства и состав мелассы.
2. Каковы показатели состава мелассы соответствующей требованиям дрожжевого процесса?
3. Какие примеси мелассы влияют неблагоприятным образом на культивирование дрожжей?
4. Какие вещества, используемые в производстве дрожжей, относят к основным материалам?
5. Какие вещества, используемые в производстве дрожжей, относят к вспомогательным материалам?

Тема 3. Подготовка мелассы для производства хлебопекарных дрожжей

- 3.1. Доставка и хранение мелассы.
- 3.2. Подготовка питательной среды.
- 3.3. Рассиропка мелассы.
- 3.4. Подготовка растворов питательных солей.
- 3.5. Способы осветления мелассы.

3.1. Доставка и хранение мелассы

Поступившую на дрожжевой завод мелассу сливают из железнодорожных или автоцистерн в приемный бак (обычно подземный) и оттуда насосом перекачивают в хранилища от 500–2000 тонн мелассы по наружным и подземным мелассопроводам. Емкость мелассохранилища от 500 до 5000 м³, так как резервуар должен обеспечить 9 месячный запас мелассы, его изготавливают из стали марки ВСтЗсп. В местах пересечения мелассопроводов с шахтами для канализационных стоков возникает опасность коррозии металлических труб парами сточных вод, что в отдельных случаях приводит к непрерывной утечке мелассы со стоками. Во избежание подобных потерь необходимо тщательно изолировать трубопроводы в местах возможной агрессии. Мелассопроводы необходимо укладывать в траншеях или каналах.

В течение всего времени хранения мелассы необходимо вести постоянное наблюдение за уровнем ее в мелассохранилище, ежемесячно проводить тщательные замеры, а так же отбор и анализ средних проб для определения качественных и количественных изменений в период хранения, систематически проверять работу мелассовых весов.

Для усиления текучести мелассы при выгрузке из цистерн практикуют разогрев ее паром. При этом необходимо учитывать, что усиленный разогрев без последующего охлаждения может спровоцировать сахароаминную реакцию в хранилище, сопровождающуюся самонагреванием, «вскипанием».

Сахароаминная реакция (меланоидиновая) реакция возникает в инфицированных мелассах, в которых под действием микроорганизмов происходит инверсия сахара и протеолиз азотсодержащих компонентов. С карбоксильной группой моносахаридов реагирует аминная группа аминокислот. Как только меласса обогатится инвертным сахаром и продуктами распада азотистых веществ и если повысится температура, концентрированная реакция в концентрированной среде приобретает цепной характер. При взаимодействии моносахаров с аминокислотами образуются различные по сложности и составу промежуточные вещества, вступающие между собой в химические реакции с образованием фурфурола, оксиметилфурфурола и в конечной стадии гуминовых веществ. Комплекс экзотермических реакций сопровождается стремительным повышением температуры в хранилище до 100–150°C. Одновременно нарастает кислотность за счет исчезновения групп $-\text{NH}_2$ и высвобождения карбоксильных групп. Окраска мелассы меняется до черных тонов, увеличивается количество инверта. Образующиеся газообразные продукты (водород, аммиак, диоксид углерода и др.) взрывают среду, объем ее возрастает и наступает взрыв с выхлопом газов и твердых продуктов сахароаминной реакции. В мелассохранилище остается черная, дающая устойчивую пену, дегтеобразная вязкая масса, содержание сахара в которой равно нулю.

Для предотвращения подобных аварийных ситуаций необходимо соблюдать следующие правила:

- при сливе мелассы из цистерн допускать минимально необходимый разогрев, а при повышении температуры мелассы в хранилище выше 30° С принимать меры к ее немедленному охлаждению;
- заливать мелассу только в тщательно продезинфицированное мелассохранилище;
- при хранении мелассы в летнее время создавать возможность наружного охлаждения;
- оборудовать хранилища термометрами и осуществлять систематическое наблюдение за температурой мелассы на разных уровнях;
- не допускать длительного хранения мелассы инфицированной с кислой реакцией и содержанием С.В. менее 74%;
- не допускать соседство мелассовых трубопроводов с паровыми.

Длительное хранение полезно для нормальных меласс, поскольку происходит оседание взвеси механических примесей, уменьшение количества микроорганизмов, частичное перемешивание и так называемое созревание мелассы.

При хранении и транспортировке мелассы наблюдается естественная убыль сахара в мелассе содержащей 15 тыс. м.о. в 1 г. Потери сахара при двухмесячном хранении составляют 0,43% ежемесячно, а при четырехмесячном хранении около 0,25% ежемесячно.

3.2. Подготовка питательной среды

При выращивании хлебопекарных дрожжей подготавливают питательную среду, обеспечивающую растущие дрожжи всеми компонентами, входящими в состав дрожжевой клетки, так и теми веществами, которые способствуют быстрому их росту и размножению.

Для питания микроорганизмов необходимы углерод, азот, фосфор, калий, магний, микроэлементы и ростовые вещества.

Источниками углерода для дрожжей являются различные усвояемые углеводы, моно- и дисахара, а также спирты, альдегиды и органические кислоты.

Азотистым питанием могут быть растворимые соединения азота (органические и неорганические). Сложные высокомолекулярные углеводы и протеины дрожжами не усваиваются, так как в них не содержатся ферменты, гидролизующие эти вещества. Дрожжи усваивают продукты распада белков – аминокислоты, амиды и аммонийные соединения. Бетаин и нитраты дрожжи не потребляют.

Большую роль в жизнедеятельности дрожжей играют макроэлементы (К, Na, P, Mg, Ca) и микроэлементы (Fe, Cu, Mn, Al и др.), поэтому их присутствие в питательной среде обязательно.

Дрожжам необходимы также ростовые вещества и витамины, особенно биотин. Сахаромицеты не способны синтезировать биотин, и для нормального их развития они потребляют его из питательной среды.

В дрожжевом производстве питательной средой является осветленный раствор мелассы, растворы питательных солей и ростовых веществ. Соли, содержащие фосфор и азот, добавляют, исходя из того, что готовая продукция должна содержать 6–7 % азота и 3,6–4,4 % P_2O_5 в пересчете на сухие вещества дрожжей. В качестве источни-

ка стимуляторов роста чаще всего используется кукурузный экстракт, дрожжевой автолизат и дестиобиотин. Кукурузный экстракт добавляют из расчета 6 % к массе мелассы, дестиобиотин – 400 мг на 1 т мелассы. При переработке мелассы с содержанием золы ниже 7 % в среду добавляются калийные и магниевые соли. Количество добавляемого калия (K_2O) составляет 3,5 % к массе мелассы. При внесении магния учитывают, что его содержание в мелассе должно составлять не менее 0,15 % (MgO).

Подготовка питательной среды состоит из следующих этапов:

- а) гомогенизация мелассы;
- б) осветление и антисептирование;
- в) нормализация состава мелассы.

А). Состав мелассы не постоянен, он меняется не только в разные периоды сахароварения, но даже в течение суток. В хранилище меласса располагается пластами и очень медленно диффундирует в слои соседних пластов. Для эффективной переработки ее необходимо тщательно перемешать до получения гомогенной массы. Гомогенизацию производят непосредственно в хранилищах путем многократного перекачивания с подачей в разные места резервуара, либо перемешиванием, сжатым воздухом, продуваемым под давлением.

Б) В результате осветления должны быть получены растворы мелассы с устойчивой прозрачностью, в течение 4 ч не должен выпадать осадок, допустима лишь легкая опалесценция. На не осветленном сусле не зависимо от степени его подкисления дрожжи получают с пониженным выходом, стойкостью и подъемной силой по сравнению с таковыми показателями дрожжей, полученных на осветленном сусле. Кроме того, возникает постоянная опасность инфекции, которая влечет за собой нарушение производственного режима и всех показателей работы предприятия.

В) Нормальная меласса соответствует всем основным показателям технических условий на мелассу. Степень пригодности мелассы для дрожжевого производства выявляется при сопоставлении состав зольных и ростовых веществ дрожжей и мелассы, а также по скорости накопления биомассы дрожжей методом микропробы. Для нормализации состава среды используют различные технологические приемы. Например, при низкой зольности (золы меньше 14 г на 100 г сахара) добавляют зольные элементы в количестве, восполняющем недостаток их в мелассе с учетом ожидаемого выхода дрожжей.

Если в мелассе недостаток усвояемого азота (менее 0,3%), то дозируется азотистое питание в количестве, восполняющем недостаток азота. При наличии ингибиторов таких как серноокислый ангидрид более 0,035% применяют хлорирование мелассы на 100 г серноокислого ангидрида – 110 г активного хлора. При наличии летучих кислот более 0,5% применяют горячее осветление с продуванием воздуха и т.д.

3.3. Рассиропка мелассы

Меласса, поступающая на дрожжевые заводы подлежит предварительной подготовке которая включает: разбавление водой (рассиропка), подкисление, осветление, пастеризацию или стерилизацию. Разбавление мелассы водой (рассиропка), с целью уменьшения ее плотности и увеличения эффективности осветления, осуществляется в рассиропниках непрерывного или периодического действия.

При использовании рассиропников периодического действия осветление мелассы происходит в самих рассиропниках (заторный способ осветления).

Рассиропник непрерывного действия представляют собой вертикальный цилиндрический корпус внутри, которого на стойках закреплены 8–10 сетчатых тарелок с отверстиями 15–20 мм. Каждая тарелка имеет вырез расположенный к вырезу соседней тарелки с противоположной стороны. Благодаря чему путь прохождения смеси удлиняется и улучшаются условия перемешивания вследствие встречи вертикальных и горизонтальных струй раствора.

3.4. Подготовка растворов питательных солей

Растворы сульфата аммония $(NH_4)_2SO_4$, диаммонийфосфата $(NH_4)_2HPO_4$, и сульфата магния или магния серноокислого $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Готовят отдельно на суточную или сменную потребность. Резервуары для растворения должны быть изготовлены из кислотоупорных материалов и снабжены мешалками. Соль дозируют из расчета 100 кг на 1 м³ раствора, перемешивают в течение 30 мин, оставляют в покое на 3–4 ч для осаждения взвеси и декантируют в мерники для подачи в дрожжерастильный аппарат. Раствор диаммонийфосфата готовят при pH 6,0–6,5. Воду подкисляют серной кислотой до засыпки диаммонийфосфата.

Водная вытяжка суперфосфата $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$. В чан с мешалкой и барботером, изготовленных из антикоррозионных материалов, набирают воду и при перемешивании небольшими порциями всыпают суперфосфат. Смесь подогревают открытым паром до 45–50°C, перемешивают 5–6 часов, останавливают мешалку и оставляют в покое на 10–12 часов. Осветленный раствор декантируют и направляют в приточные чаны одновременно с мелассой либо в специальные сборники для дозирования непосредственно в дрожжерастильный аппарат.

Растворы хлористого калия можно растворять и дозировать вместе с мелассой или давать непосредственно в дрожжерастильный аппарат в виде 10–20% раствора при складке и в период отборов.

Кукурузный экстракт перед подачей в дрожжерастильный аппарат необходимо тщательно антисептировать. С этой целью экстракт разводят водой в соотношении 1:1, нагревают до 100°C, затем охлаждают либо без нагревания обрабатывают биомицином. Рекомендуется так же способ пастеризации экстракта с фуросолидоном.

Большое значение имеет режим подачи питательных солей, так например фосфорсодержащие соли, соли магния и калия задают в начале складки в воду перед подачей маточных дрожжей. Эти компоненты усваиваются дрожжами по мере надобности, а их избыток не сказывается на процессе. Дозировка их при складке способствует так же выравниванию осмотического давления в среде в начале цикла. Азот следует дозировать в среду в количествах соответствующих приросту биомассы дрожжей, по графику притока мелассы в связи с тем, что азот используется дрожжами наравне с углеродом для синтеза белка. На стадии отборов все соли дозируют ежедневно.

3.5. Способы осветления мелассы

В дрожжевом производстве питательной средой является разведенная водой меласса, освобожденная от механических примесей, коллоидов и частично микроорганизмов, так называемый осветленный мелассовый раствор, и растворы питательных солей.

Существует ряд способов осветления мелассы, которые могут быть разделены на химические и механические. Химические способы связаны с применением серной кислоты и суперфосфата, способствующих коагуляции и осаждению более крупных взвешенных час-

тиц и коллоидов. Серная кислота разрушает водную оболочку коллоидов, препятствующую их коагуляции. Кроме того, серная кислота, соединяясь с солями мелассы, вытесняет органические кислоты, расщепляет протеины и создает активную кислотность (рН среды), благоприятную для размножения дрожжей. На производстве применяются кислотно-холодный и кислотно-горячий способы осветления.

При кислотно-холодном способе в заторный чан набирают воду и мелассу из расчета около 0,75 м³ воды на 1 т мелассы. Затем смесь (затор) перемешивают при помощи мешалки и всыпают хлорную известь (из расчета 0,9 кг активного хлора на каждую тонну мелассы), после чего продолжают перемешивание еще 30 мин и оставляют затор в состоянии покоя еще на 30 мин. По истечении этого времени вновь включают мешалку и вливают серную кислоту (плотн. 1,84) из расчета около 6 л на 1 т мелассы, после чего продолжают перемешивание еще 30 мин и вливают воду до концентрации СВ мелассы от 20 до 40% (в зависимости от принятой на заводе концентрации). Затор перемешивают еще 30 мин, затем дают ему отстояться в течение 6–12 ч для выпадения осадка.

При кислотно-горячем способе осветление ведется по аналогичной схеме до момента вторичного добавления воды. В заторный чан наливают горячую воду и доводят затор до кипения при помощи пара. Кипячение длится 30 мин, после чего затору дают отстояться в течение 6–8 ч для выпадения осадка.

При этом способе используется серной кислоты на 1/3 меньше, чем при кислотно-холодном способе.

В настоящее время химические методы осветления мелассы все больше вытесняются механическими, которые осуществляются на кларификаторах, где для отделения взвешенных частиц используется центробежная сила, превосходящая в 10 тыс. раз величину силы тяжести, возникающую при отстаивании мелассы. Кларификаторы сейчас широко применяются в дрожжевой промышленности. На дрожжевых заводах осветление мелассы на кларификаторах производится с 1955 г. Преимущества механического способа осветления заключаются в следующем: экономия мелассы, вспомогательных материалов, пара, рабочего места, времени.

Перед пуском на кларификатор мелассу взвешивают, перепускают по трубопроводу в заторный чан, разбавляют водой в соотношении от 1:1 до 1:4, добавляют серную кислоту до рН 5. Концентрация СВ осветленной мелассы колеблется от 45 до 20%.

Разбавление мелассы водой перед кларификаторами зависит от состава мелассы: если в мелассе солей кальция менее 0,5%, разбавление делается 1:1, если их 0,6–1,0%, мелассу разбавляют водой в соотношении 1:2 и 1:3, а при повышенном содержании солей кальция (более 1,0%) разбавление увеличивают до 1:4.

Помимо описанного выше холодного режима осветления мелассы на кларификаторах применяют и горячий режим. В этом случае разбавленную мелассу сначала нагревают в промежуточном сборнике до 85–90 °С, затем подают на пластинчатый стерилизатор, где стерилизуют 15с при 125° С, затем охлаждают до 80–85° С и передают на кларификатор. При этом способе осветления серную кислоту не применяют.

Дерканосовым Н.И. и Осиповым М.Ф. предложен двухступенчатый режим осветления мелассы. При этом ее разбавляют горячей водой до концентрации СВ 40–50% и направляют на кларификатор со средней частотой вращения для отделения основного количества шлама. После первой ступени сепарации частично осветленную мелассу разбавляют холодной водой до концентрации СВ 15–25% и направляют на второй кларификатор с максимальной частотой вращения, где отделяются мелкие примеси и коллоидные вещества. В связи с тем, что во второй ступени сепарируется охлажденная меласса, осветленный раствор не образует осадка в приточном сборнике, что является большим преимуществом этого способа.

Кларификаторы бывают периодического действия с барабаном, выполненным из цилиндрических вставок, и непрерывного действия с барабаном из конических тарельчатых вставок.

На многих отечественных дрожжевых заводах установлены кларификаторы марки ВСМ. Они относятся к многокамерным центрифугам полужакрытого типа. Осадок после остановки кларификатора удаляют вручную.

Производительность кларификатора ВСМ 1800–2000 л густой мелассы в час, частота вращения барабана 4170 об/мин, мощность электродвигателя 10 кВт.

На ряде дрожжевых заводов установлены саморазгружающиеся, с автоматическим выбросом шлама кларификаторы (марок РХ и ВКРХ фирмы «Де-Лаваль». Производительность от 2000 до 5000 л густой мелассы в час.

Мелассовый раствор, подлежащий осветлению, очищается от взвешенных веществ при переходе через ряд тарелок и вытесняется из барабана установленным в его верхней части напорным диском. Выгрузка осадка и жидкости осуществляется мгновенно, при этом в кларификатор поступает вода, вытесняющая сепарируемую жидкость и осадок из барабана.

Вопросы

1. Что собой представляют мелассохранилища?
2. Каковы основные правила хранения и транспортировки мелассы?
3. Из каких этапов состоит подготовка питательной среды для производства дрожжей?
4. Какие способы разбавления мелассы водой существуют?
5. Как подготавливают растворы питательных солей для дрожжевого производства?
6. Какие существуют способы осветления мелассы?

Тема 4. Биологические особенности дрожжей – сахаромицетов, применяемых в дрожжевом производстве

- 4.1. Признаки, используемые в систематике дрожжей.
- 4.2. Способы хранения чистых культур дрожжей.
- 4.3. Расы дрожжей.
- 4.4. Строение дрожжевой клетки.
- 4.5. Особенности метаболизма дрожжей.

4.1. Признаки, используемые в систематике дрожжей

В период первичного накопления знаний о грибах выдающийся систематик Карл Линей назвал царство грибов «Царство хаоса», так как сложно было найти закономерность в большом разнообразии непостоянных признаков присущих этим уникальным организмам.

Набор признаков, на основании которых выделяются виды у дрожжей, постоянно меняется в связи с принятием той или иной концепции вида, в результате пересмотра таксономической значимости признаков, с появлением новых методов и технологий. Систематика грибов до последнего времени основывалась главным образом на морфологических признаках, таких как пигментация, строение конидиеносцев, форма спор и т.п. Одноклеточные грибы не обладают такой сложной разнообразной морфологией, как мицелиальные. Поэтому уже с первых работ Э. Хансена и А. Клюйвера в 20-х гг. XX в. разделение видов дрожжей основывалось не только на морфологических, но и на физиологических признаках, таких как способность к сбраживанию и аэробной ассимиляции различных углеводов. Количество используемых для описания вида источников углерода и азота было значительно расширено в 50-е гг. Викерхэмом, который также разработал стандартные среды для постановки физиологических тестов. Эти критерии прочно вошли в практику классификации и идентификации дрожжей и используются до настоящего времени.

По своей природе признаки, используемые в систематике дрожжей, можно разбить на следующие группы.

Макроморфологические (культуральные) признаки, которые характеризуют рост штамма на различных средах. К ним относятся особенности роста в жидких средах (образование пленки, мути, осадка), формирование гигантской колонии и ее характеристики, образование плодовых тел.

Микроморфологические признаки – особенности клеточной морфологии: размеры и форма клетки, тип вегетативного размножения, строение мицелия и псевдомицелия, формирование бесполовых спор (баллистоспор, хламидоспор), характеристики полового размножения (гологамия или педогамия, форма аскоспор и др.) (<http://soil.msu.ru/soilyeasts/pics/VegitoTypes.htm>).

Цитологические признаки – особенности строения клеток и клеточных структур, например, строение клеточной стенки, структура септ мицелия.

Физиологические признаки, определяющие тип питания и способность к росту в различных условиях. К ним относится определение способности к анаэробному сбраживанию или аэробной ассимиляции различных источников углерода, способность к росту при различных значениях рН, осмотического давления среды, устойчивость к различным ингибиторам роста.

Биохимические признаки, характеризующие химический состав клетки и отдельных ее компонентов: образование ферментов, специфических метаболитов, внеклеточных продуктов, например, моносахаридный состав внеклеточных полисахаридов.

Генетические признаки, включающие характеристики генома.

Арсенал генетических признаков и методов их определения особенно расширился в последнее время в связи с интенсивным развитием молекулярной биологии и стал играть ключевую роль в систематике дрожжей. К ним относятся нуклеотидный состав ДНК, степень гомологии ДНК у разных видов, наличие уникальных олигонуклеотидных последовательностей в геноме, последовательность нуклеотидов в определенных генах.

Экологические признаки, определяющие характер распространения вида в природных местообитаниях, а также чувствительность или резистентность к различным экологическим факторам, патогенные свойства.

Для выявления всех этих признаков разработаны стандартные методы, описываемые в определителях или специальных руководствах.

Морфологические характеристики, имеющие наибольшее значение для дифференциации родов дрожжей, были подробно рассмотрены выше. Для разделения видов у дрожжей традиционно использовались в основном физиологические характеристики – способность к росту на различных источниках углерода и азота.

Некоторые цитологические и биохимические критерии, разработанные в последние десятилетия, сыграли особенно большую роль в классификации дрожжей на родовом и надродовом уровне, значительно изменив представления об их группировании и филогении. Эти признаки имеет смысл рассмотреть более подробно.

Изучение полисахаридов, которые составляют клеточную стенку и капсулу, оказало существенное воздействие на систематику и представления о филогении дрожжей. Характеристика моносахаридного состава полисахаридов клеточных стенок используется главным образом для дифференциации дрожжей на родовом и надродовом уровне. В то же время, детальные исследования химического состава клеточной стенки были проведены лишь у небольшого числа видов дрожжей. Наиболее подробно исследовано строение клеточной стенки *Saccharomyces cerevisiae* и нескольких близких аскомицетовых видов. Наряду с глюканом и маннаном почкующиеся аскомицетовые дрожжи содержат около 1–2 % хитина, который почти полностью локализован в областях шрамов почкования. Однако небольшое количество хитина (около 0,1 %) рассеяно по всей клеточной стенке. Напротив, дрожжи базидиомицетового аффинитета характеризуются намного более высоким содержанием хитина (до 10 %). Таким образом, это различие можно использовать в качестве таксономического признака для разделения аскомицетовых и базидиомицетовых анаморф. Кроме того, оказалось, что содержание хитина в стенках некоторых мицелиальных аскомицетовых дрожжей, например, у видов *Saccharomycopsis*, значительно выше, чем у истинных одноклеточных дрожжей, таких как *Saccharomyces cerevisiae* (<http://soil.msu.ru/soilyeasts/pics/AscosporeForms.htm>).

После доказательства полифилетической природы таких крупных дрожжевых родов, как *Candida*, в зимологии начался активный поиск признаков, которые могли бы дифференцировать анаморфы аско- и базидиомицетов. К настоящему времени в систематике дрожжей используется целый набор таких признаков аффинитета, благодаря которым все дрожжи удается четко разбить на две группы – аскоми-

цетовые и базидиомицетовые, независимо от телеоморфного или анаморфного состояния культуры.

Развитие методов секвенирования рРНК окончательно решило проблему определения аффинитета несовершенных дрожжей. Одно из главных преимуществ систематики, основанной на сравнении нуклеотидных последовательностей консервативных генов – возможность классификации на одной и той же основе как совершенных видов дрожжей, обладающих полным жизненным циклом, так и их анаморф.

Вновь описываемые виды должны типифицироваться штаммами, которые помещают в крупные коллекции, где они поддерживаются в живом состоянии. Это делает их доступными для научной общности. Кроме хранилищ таких штаммов коллекции выполняют различные функции: научные, учебные, производственные. Они проводят патентование практически ценных штаммов, осуществляют обмен и выдачу культур для разных целей, проводят таксономические исследования, составляют периодически публикуемые каталоги. Коллекции дрожжей различаются как по своему объему, так и по направленности. Есть очень крупные, хорошо известные в научном мире коллекции, где проводятся широкие исследования по систематике дрожжей, разрабатываются способы наилучшего хранения штаммов. Есть и небольшие, но очень ценные коллекции, где собраны штаммы с конкретной целью, служащие для выполнения специальных исследований (Жвирблянская А.Ю., Исаева В.С. Дрожжи в пивоварении. – М.: Пищевая промышленность. 1979. – 246 с.).

Крупнейшая коллекция дрожжей – CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures). Эта коллекция была создана в 1904 г. по решению 11-го международного Ботанического Конгресса в Вене. Она поддерживается Королевской Нидерландской академией искусств и наук и до 2000 г. располагалась на родине Левенгука в г. Дельфте. В настоящее время коллекция CBS находится в г. Утрехте и является мировым центром по изучению систематики дрожжей. Главным образом на базе этой коллекции была создана серия определителей дрожжей, содержащих описания всех известных видов и диагностические ключи для их идентификации.

Среди других крупных коллекций дрожжей ВКМ (Всероссийская коллекция микроорганизмов) и ВКПМ (Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов) в России, АТСС (American Type Culture Collection) в США, IFO (Institute of Fermentation in Osaka) в

Японии, CCY (Culture Collection of Yeasts) в Словакии, NCYC (National Collection of Yeast Cultures of the United Kingdom) в Англии. Существует также ряд крупных специализированных коллекций дрожжей, например, генетически модифицированных штаммов *Saccharomyces cerevisiae*, штаммов, используемых в виноделии и других биотехнологических процессах.

4.2. Способы хранения чистых культур дрожжей

Основная проблема, с которой сталкиваются работники микробиологических коллекций – необходимость длительного поддержания чистых культур в жизнеспособном состоянии. Для хранения дрожжевых культур используются разные методы, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки (Бабицкая В.Г., Стахеев И.В., Костина, А.М. и др. Образование белка смешанными культурами гриба *Penicillium digitatum* 24 П и дрожжей // Микробиол. пром-сть. 1977. Вып. 11 (153). С. 32–34).

Наиболее доступный и широко применяемый метод хранения – поддержание культур путем их периодических пересевов, обычно в пробирках со скошенным агаром. Сроки пересевов определяются скоростью высыхания среды и зависят от температуры и влажности помещения. Промежутки между пересевами можно увеличить за счет более плотного закупоривания пробирок и снижения температуры хранения. Хранение в холодильной камере при температуре около 5°C дает возможность увеличить сроки пересевов до 2–3 лет. Для предотвращения высыхания культур используют заливку культур минеральным маслом. Этот способ позволяет сохранять культуры большинства видов дрожжей без пересевов в течение 10 и более лет (Аркадьева З.А., 1989).

Другой способ, используемый для длительного хранения дрожжевых культур – лиофилизация, то есть высушивание под вакуумом из замороженного состояния. Лيوфилизированные культуры хранят в запаянных стеклянных ампулах при комнатной температуре или в холодильнике. Такие культуры могут сохраняться в жизнеспособном состоянии в течение нескольких десятилетий.

Недостатком этого способа является невозможность визуального контроля за жизнеспособностью культуры. Кроме того, не все виды дрожжей выдерживают процесс лиофилизации, а при длительном хра-

нении лиофилизированных культур могут происходить существенные изменения в их метаболизме.

В последнее время все шире применяется еще один способ длительного хранения культур микроорганизмов – замораживание в жидком азоте. Замороженные в ампулах культуры хранят в специальных контейнерах-рефрижераторах с жидким азотом при температуре – 196°C. Такой способ позволяет сохранять жизнеспособные культуры дрожжей в течение практически неограниченного времени.

Определение видовой принадлежности дрожжей – сложная процедура, требующая не только большого опыта, но и, как правило, достаточно длительных лабораторных исследований, связанных с постановкой серии тестов для определения рассмотренных выше морфологических, физиологических и биохимических признаков. Лишь после составления достаточно полного описания штамма возможна его надежная видовая идентификация. В последнее время, для идентификации дрожжей по таким описаниям, наряду с традиционными дихотомическими ключами, широко используются компьютерные технологии нумерической идентификации. Такая идентификация может осуществляться на основе любой СУБД (средство управления базами данных), в которую внесены стандартизованные признаки всех видов дрожжей. В процессе идентификации программа поочередно сравнивает описание идентифицируемого штамма с описанием каждого вида и высчитывает уровень сходства (долю совпавших признаков от общего количества использованных признаков). Результирующая информация представляет собой список видов, ранжированный по уровню сходства с идентифицируемым штаммом. Существуют специализированные программы для идентификации дрожжей.

4.3. Расы дрожжей

Под расой понимают разновидность микроорганизмов, которые, сохраняя все основные признаки данного вида, отличаются второстепенными, но стойкими свойствами, характеризующими их производственные особенности. Часто расы называют штаммами, это не верно, т.к. штамм – это разновидность данного вида, апробированная только в лабораторных условиях.

На дрожжевых заводах выращивают дрожжи сахаромицеты, по культуральным и морфологическим признакам они относятся к се-

мейству *Endomycetaceae*, к роду *Saccharomyces*, к виду *cerevisiae*. Дрожжевые грибы этого вида широко используются в практике различных бродильных производств: одни расы применяются в спиртовом производстве, другие в пивоварении, а в дрожжевом производстве – третьи. Расовой особенностью тех или иных дрожжевых штаммов считаются признаки, ценные для того или иного производственного процесса. В дрожжевом производстве ценятся быстро размножающиеся расы дрожжей, обладающие хорошей подъемной силой, хорошей стойкостью при хранении и способные активно сбраживать сахара – сахарозу, глюкозу, мальтозу. Находят применение расы, устойчивые в процессе высушивания. В производстве прессованных хлебопекарных дрожжей предпочтительно используются расы дрожжей, характеризующиеся дрожжевыми клетками крупного размера диаметром от 6–8 до 7–9 мкм с высокой мальтазной и зимазной активностью.

Мальтазной активностью называют способность дрожжей расщеплять мальтозу, а затем сбраживать образовавшуюся глюкозу (не более 70 минут).

Зимазной активностью называют способность дрожжей расщеплять сахарозу, а затем сбраживать образовавшуюся смесь глюкозы и фруктозы.

В этом отношении выгодно отличаются расы 14,11 от рас 7,28. Раса 7 малоклеточная, диаметр клеток 5–6 мкм, устойчива к составу мелассы, менее требовательна по отношению к ростовым веществам, чем расы 14 или 28, и хорошо накапливает биомассу на мелассовых растворах. Однако низкая мальтазная активность расы 7 как в исходной культуре, так и в готовой продукции (в прессованных дрожжах) ограничивает использование ее на хлебопекарных предприятиях. Кроме того, прессованные дрожжи расы 7 уступают по товарным качествам расе 14 по цвету и консистенции. Раса 28 с размером клеток в диаметре 6–7 мкм, со средней мальтазной активностью, хорошей стойкостью, менее прихотливая к составу мелассовой среды, чем раса 14 или 11. Однако она уступает им в выходах на 2–3% при выращивании по воздушноприточному способу. Раса 28 применяется на дрожжевых заводах, вырабатывающих сушеные дрожжи.

В связи с изменчивостью дрожжей – сахароцементов наблюдается как бы приспособление дрожжей исходной чистой культуры к

условиям технологического процесса на различных заводах. Поэтому чистые культуры той же расы, выделенные из того же завода, иногда дают лучшие результаты на этом предприятии, чем чистая культура из лабораторных коллекций.

Как видно из приведенных данных, ни одна из применяющихся в настоящее время рас дрожжей не сочетает в себе всех универсальных положительных признаков удовлетворяющих требования дрожжевого производства. В связи с этим, в лаборатории генетических методов селекции проведена селекция новых рас дрожжей методом гибридизации. При этом новые свойства у дрожжевых организмов возникают в результате слияния прорастающих спор или вегетативных гаплоидных клеток родительских форм дрожжей разных видов или рас. Образующиеся при этом гибриды часто более жизнеспособны и обладают повышенной энергией размножения, чем исходные родительские расы.

Первые гибриды дрожжей были открыты британским ученым А. Винге в 1938 г., а в 1946 г. он получил удачный гибрид, скрещиванием двух рас хлебопекарных дрожжей который был значительно эффективней рас применяемых в то время на заводах Англии. Н. Гужинская, путем скрещивания хлебопекарных и спиртовых дрожжей, получила гибрид, который оказался продуктивней родительских рас на 6–10%. В 1962–1963 гг. К.В. Косиковым и С.Н. Бочаровым было получено 15 гибридов от скрещивания 4 рас хлебопекарных дрожжей, которые долгое время применялись на производстве. В настоящее время, для получения новых рас дрожжей, применяются методики генной инженерии.

4.4. Строение дрожжевой клетки

Дрожжевая клетка является эукариотным организмом, который не способен к активному передвижению и имеет свойства как растений (ригидная клеточная стенка, способность к неограниченному росту), так и признаки присущие животным (отсутствие хлоропластов и наличие гликогена).

Клетка дрожжевых грибов окружена толстой клеточной стенкой, внутри располагаются следующие органеллы: обособленное ядро, цитоплазматическая мембрана, митохондрии, рибосомы, аппарат Гольджи, лизосомы и вакуоли.

Ядро является носителем генетического материала и основным органом ответственным за контроль над биохимическими процессами, проходящими в клетке.

Цитоплазматическая мембрана представляет собой двухслойный ряд молекул фосфолипидов с белковыми молекулами. Функции цитоплазматической мембраны: активный транспорт в клетку молекул органических веществ, ионов K^+ и Na^+ и др.

Митохондрии. В митохондриях имеется собственная митохондриальная ДНК (мДНК), а также весь аппарат белкового синтеза, включая матричную РНК и 70S рибосомы (в отличие от 80S рибосом в цитоплазме). Митохондрии способны к самовоспроизведению и являются генераторами энергии в клетке.

Рибосомы выполняют функцию синтеза специфических белков дрожжевой клетки.

Аппарат Гольджи состоит из мембранных дисков (0,02 до 0,25 мкм) и является многофункциональным органом, ответственным за участие в образовании клеточных перегородок, спор, почек, транспорт токсических веществ из клетки.

Лизосомы – плотные гранулы, покрытые липопротеидной мембраной. Они содержат комплексы активных ферментов клетки. При разрыве окружающей лизосому мембраны происходит автолиз клеток.

Вакуоли. В фазово-контрастном микроскопе в клетках дрожжей хорошо видны светлые и прозрачные структуры круглой формы. Каждая вакуоль окружена одинарной мембраной и содержит различные ферменты, липиды, низкомолекулярные продукты метаболизма (аминокислоты), ионы металлов. В вакуолях сосредоточена большая часть ионов калия.

Также в клетке присутствуют: клеточная стенка, которая защищает протопласт от осмотического разрыва и придает клетке определенную форму; капсула (слизистый полисахаридный чехол вокруг клетки), цитоплазма и липиды.

4.5. Особенности метаболизма дрожжей

Хотя дрожжи и не так разнообразны по своему метаболизму, как бактерии, различные виды дрожжей могут катаболизировать разные соединения углерода и азота и образовывать различные конечные продукты. При росте в аэробных условиях, при низком содержании

глюкозы в среде, дрожжи получают АТФ за счет процессов дыхания, как это делает большинство аэробных организмов. Полное окисление углеродного субстрата до углекислого газа и воды может происходить у дрожжей в цикле трикарбоновых кислот, и в пентозофосфатном цикле. При функционировании каждого из этих циклов в клетке происходит образование восстановленных пиридиннуклеотидов. Они могут быть использованы либо для процессов восстановления в ходе биосинтеза, либо для получения АТФ путем окислительного фосфорилирования. NAD^+ становится донором электронов для электронно-транспортной цепи, в которую у дрожжей входят такие белки-переносчики электронов, как флавопротеиды и цитохромы, локализованные на внутренней мембране митохондрий. Наиболее известное свойство многих дрожжей – способность к спиртовому брожению. Многие виды дрожжей могут переключаться с бродильного метаболизма на дыхательный и обратно, в зависимости от условий: при наличии кислорода брожение ингибируется и дрожжи начинают дышать, в отсутствие кислорода включается механизм спиртового брожения. Так как кислородное дыхание – энергетически более выгодный процесс, чем брожение, то выход биомассы дрожжей в расчете на единицу используемого субстрата выше при выращивании их в аэробных условиях, чем в анаэробных. Это явление называется эффектом Пастера. Спиртовое брожение может идти не только в анаэробных условиях. Если выращивать дрожжи в присутствии кислорода, но при высоком содержании глюкозы в среде, то в этом случае дрожжи также сбрасывают глюкозу. Таким образом, глюкоза подавляет процессы аэробного дыхания. Это явление получило название эффекта Кребтри, или катаболитной репрессии. Многие дрожжи вообще не способны бродить. По соотношению между этими двумя процессами в метаболизме можно выделить следующие группы дрожжей:

Дрожжи, существующие только за счет брожения и не способные расти в аэробных условиях. К ним относится, например, вид *Arxiozuma telluris*, обитающий в кишечном тракте грызунов.

Активные бродильщики: интенсивно сбрасывают различные субстраты, но в аэробных условиях переключаются на дыхательный обмен. Представители – *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*.

Слабые бродильщики – в основном существуют за счет аэробного дыхания, но в анаэробных условиях могут бродить, однако значительно менее интенсивно, чем виды из предыдущей группы. Это аскомицетовые дрожжи из родов *Pichia*, *Debaryomyces*, а также все способные к брожению базидиомицетовые дрожжи.

Дрожжи, существующие только за счет дыхания и не способные расти в анаэробных условиях. К этой группе относятся аскомицетовые дрожжи из рода *Lipomyces* и многие несовершенные дрожжи базидиомицетового аффинитета – *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*.

Субстраты брожения. Все бродящие дрожжи сбраживают глюкозу и фруктозу, поскольку именно с этих сахаров начинается гликолитическое расщепление. Кроме глюкозы и фруктозы могут сбраживаться другие соединения. В основном к ним относятся гексозы и олигосахариды, включающие остатки гексоз. Из моносахаридов наиболее часто сбраживается галактоза, из дисахаридов – сахароза, мальтоза, трегалоза. Значительно реже встречаются дрожжи, сбраживающие лактозу и мелибиозу. Долгое время не были известны дрожжи, способные интенсивно сбраживать пентозы. Такие виды были описаны только к началу 80-х годов XX в. К ним относятся, например, *Pichia stipitis* (несовершенная стадия – *Candida shehatae*), *Rachysolen tannophilus*. Брожение ксилозы начинается с восстановления ее до ксилита с помощью фермента ксилоредуктазы. Затем ксилит окисляется ксилитдегидрогеназой до ксилулозы, которая фосфорилируется с образованием ксилулозо-5-фосфата. Последний может вступать в реакции пентозофосфатного пути, где происходит перестройка углеродного скелета ксилулозо-5-фосфата с образованием интермедиатов гликолиза.

Вопросы

1. На основании каких признаков определяют виды у дрожжей?
2. Чем раса дрожжей отличается от штамма?
3. Опишите строение дрожжевой клетки.
4. На какие группы можно разделить дрожжи по соотношению между способностью к дыханию и брожению?

Тема 5. Состав дрожжей

- 5.1. Химический состав дрожжей.
- 5.2. Ферменты дрожжей.
- 5.3. Витамины дрожжей.
- 5.4. Жиры и углеводы дрожжей.

5.1. Химический состав дрожжей

Химический состав дрожжей непостоянен: он зависит от филологического состояния дрожжевой клетки, расы дрожжей, состава питательной среды и условий культивирования.

Прессованные дрожжи содержат 25–28 % сухого вещества и 72–75% влаги. Относительная плотность (уд. вес) хлебопекарных дрожжей 1,100, дрожжевой взвеси с содержанием 17,22% сухих веществ – 1,0566, а с содержанием 23,71 % сухих веществ – 1,0821. Теплоемкость сухих дрожжей 0,664, теплотворная способность 1 кг сухеных дрожжей по Шюлейну составляет 4520 кал; по Финку она колеблется в пределах 4808–5066 кал для кормовых дрожжей. Принято считать, что дрожжевые клетки в среднем содержат 67% воды и 33% сухого вещества. Вода с растворенными в ней минеральными и органическими веществами проникает в клетку и, очевидно, все важные жизненные реакции происходят в водном растворе: свободная вода участвует в процессах обмена веществ, связанная вода удерживается белковыми молекулами при помощи водородных связей и, таким образом, является частью структуры протоплазмы дрожжевой клетки. Распределение влаги в прессованных дрожжах зависит от состава дрожжевых клеток. Так, при наличии 75% влаги распределение ее в бруске – внутри или вне клеток, будет изменяться, причем внеклеточной влаги будет тем меньше, чем больше ее содержится в самих дрожжевых клетках.

В дрожжевых клетках содержание влаги (в %) колеблется в следующих пределах:

Номер образца	1	2	3	4	5	6
Сухие вещества	30	31	32	33	31	35
Влага	70	69	68	67	66	65

В прессованных дрожжах при содержании 75% влаги и 25% сухих веществ внутри клеток будет содержаться разное количество влаги в зависимости от состава дрожжевых клеток.

Номер образца	1	2	3	4	5	6
Сухие вещества	25	25	25	25	25	25
Влага						
внутри клетки	58,25	55,65	53,13	50,70		
вне клеток	18,75	19,35	21,87	24,2	26,48	

Элементарный состав дрожжей с содержанием 55% белков включает 40% углерода, 6,9% водорода, 9,1% азота, 30% кислорода и 8% неорганических веществ, в основном калия и фосфора.

Однако состав сухих веществ хлебопекарных дрожжей (в %), как видно из данных, приведенных ниже, значительно колеблется.

Азот, общее количество	6–8
Белок (Nx0,25)	37–50
Сырой жир	1,5–2,5
Безазотистые вещества	35–45
Зола	6–10

Соотношение белков и углеводов зависит от расы дрожжей и от направленного его изменения в процессе выращивания дрожжей.

Азотсодержащие вещества дрожжей представляют собой белковые вещества (63,8%), нуклеиновые вещества (20,1%), амиды и пептоны (10,1%). Белки состоят из аминокислот, число которых достигает 24. Соотношение аминокислот в разных белках различно. Около 64% общего азота дрожжей входит в состав белков.

В дрожжах содержится около 0,1% глутатиона (трипептида), состоящего из гликоля, цистеина и глутаминовой кислоты. Глутатион может находиться в окисленной или восстановленной форме, при этом его сульфгидрильная группа SH активизирует протеазы (<https://helpiks.org/6-16080.html>).

5.2. Ферменты дрожжей

Непрерывной составной частью протоплазмы дрожжевых клеток являются ферменты, осуществляющие разнообразные биохимические превращения в дрожжевой клетке.

Известно, что деятельность ферментов может проявляться внутри клеток – это эндоферменты; ферменты, действующие вне клеток,

называются экзоферментами. Экзоферменты готовят питательные материалы в окружающей среде, переводят нерастворимые и труднодиффундирующие в клетку соединения в растворимые и легкоусвояемые. Эндоферменты, свойственные обычно дрожжевой клетке, ускоряют химические реакции процессов дыхания и брожения, а также те реакции, которые приводят к образованию самой протоплазмы клетки.

Учение о ферментах является в настоящее время самостоятельной и обширной областью знаний; огромный материал, по этому разделу науки приведен в специальных монографиях. В большинстве ранее проведенных исследований по изучению химической природы ферментов и характеру их действия использовались очищенные препараты ферментов, что не позволяет результаты этих работ полностью использовать для изучения ферментативных процессов в живой клетке.

В современном представлении ферменты являются двухкомпонентными соединениями: основной компонент – апофермент – белок связан с небелковым органическим соединением – коферментом, непременно участвующим в ферментативном процессе. Многие коферменты являются витаминами или их производными: пиродифосфорный эфир витамина В₆, витамин В₂, амид никотиновой кислоты (витамин РР) входят в состав окислительно-восстановительных ферментов; витамин В₆ – это кофермент ряда ферментов, катализирующих превращение аминокислот в процессе переаминирования; витамин Н-биотин, пантотеновая и фолиевая кислоты являются коферментами, присоединенными к белковой части ферментов, осуществляющих сложные биохимические превращения в протоплазме дрожжевых клеток в процессе роста и размножения.

Известно более 875 различных ферментов; по современной номенклатуре они разделяются на шесть классов. Особое значение в жизнедеятельности дрожжей имеют оксиредуктазы – окислительно-восстановительные ферменты, трансферазы – ферменты, осуществляющие перенос различных групп с одной молекулы на другую, катализирующие взаимопревращения различных сахаров, и гидролазы, гидролизующие ферменты, которые производят расщепление веществ при обязательном участии воды, присоединяющейся к образующимся более простым соединениям.

Работами Палладина Л.В., Опарина А.И., Кирсанова А.Л. установлено, что в живой клетке ферментативные процессы регулируются гетерогенным, неоднородным строением протоплазмы клеток; вследствие пространственной разобщенности могут одновременно существовать и ферменты и вещества, на которые они могут действовать. Ферменты располагаются в клетке между адсорбирующими его телами и между гомогенным раствором; при этом синтезирующее действие свойственно адсорбированному ферменту; гидролизующее действие того же фермента проявляется в гомогенном растворе. Вероятно, что и направленность ферментативного действия в клетке обусловлена количественным соотношением адсорбированного фермента и фермента, находящегося в водном растворе.

Ферменты подвергаются влиянию физических и химических факторов: они неустойчивы к свету, к воздействию температуры; активная кислотность среды, ее минеральный состав, наличие солей тяжелых металлов или дезинфицирующих веществ, веществ роста – не безразличны для ферментов; активность их повышается или понижается.

Живая дрожжевая клетка обладает способностью реагировать на воздействие физических и химических факторов окружающей среды и регулировать свою биохимическую деятельность. В убитой клетке первое время ферменты осуществляют свойственную им работу, вскоре, однако, теряется согласованность в работе ферментов, свойственная живой клетке: процессы синтеза уступают место процессам распада, одни ферменты разрушают другие. Принято характеризовать ферменты по тем реакциям, которые они ускоряют, или по тем химическим веществам, которые вступают в эти реакции. Не касаясь вопросов классификации ферментов вообще, изложенной в специальных руководствах, перечислим ферменты, которые регулируют жизнедеятельность дрожжевых клеток.

Весь комплекс ферментов дрожжевой клетки обозначают известным в ферментологии термином - голоферменты, при этом устойчивый к нагреванию комплекс называют коферментом, а неустойчивый – апоферментом. По этой терминологии процессы брожения будут вызываться в дрожжах голозимазой, состоящей из козимазы и апозимазы.

Козимаза тесно связана с апозимазой и является активатором для этой последней. Как уже выше указывалось, в противоположность

апозимазе она термостабильна и способна диализировать. Козимаза представляет собой вещество низкомолекулярной массы – нуклеотид, состоящий из аденина, рибозофосфорной кислоты и амида никотиновой кислоты. Именно последнему приписывается активирующее действие козимазы, причем обычно амид никотиновой кислоты отожествляют с витамином В₅.

Апозимаза представляет собой термолабильную часть энзимного комплекса, собственно зимазу, сбраживающую сахара. Она включает ряд энзимов, которые и вызывают процессы брожения. Многие из них еще не удалось выделить из дрожжевого сока.

В состав апозимазы входят фосфатаза, зимогексаза, мутаза, карбоксилаза. Кроме того, в дрожжах имеются карбогидразы, расщепляющие сложные углеводы на простые.

Сахараза расщепляет сахарозу на левулезу и глюкозу; оптимальная температура действия этого фермента 55°C, оптимальным рН 4,0–5,0.

Мальтаза расщепляет мальтозу на две молекулы глюкозы; оптимальной температурой является 40°C, оптимальный рН 7,0.

Лактаза расщепляет лактозу на глюкозу и галактозу; она лучше всего расщепляет этот сахар при рН 7,0.

Трегалаза разлагает трегалозу на глюкозу и левулезу.

Раффиназа (мелитриаза) расщепляет раффинозу на левулезу и мелибиозу.

Мелибиаза расщепляет мелибиозу на глюкозу и галактозу и содержится обычно в дрожжах низового брожения, например, в дрожжах, применяемых в пивоварении.

Гликогеназа расщепляет гликоген, этот фермент не проникает из клетки в окружающую среду и воздействует только на тот гликоген, который имеется в протоплазме дрожжевой клетки.

Инулаза расщепляет инулин до левулезы, этот фермент найден в делящихся дрожжах – шизосахаромицетах.

В дрожжевых клетках содержатся также и протеолитические ферменты протеазы, которые делятся на две группы – протеиназы и пептидазы. Классификация их за последние годы подвергалась пересмотру на основе накопившегося экспериментального материала по деятельности растительных протеолитических ферментов, отличных от протеазы животного происхождения.

Протеолитическая система дрожжевых клеток состоит из следующих ферментов: протеиназы (папаина), вызывающей распад белков до альбумоз, пептонов и аминокислот при слабокислой реакции среды; аминополипептидазы, расщепляющей полипептиды до дипептидов и аминокислот, и дипептидазы, образующей аминокислоты из дипептидов; деятельность этих последних ферментов проявляется в щелочной среде от рН 7,5 и выше.

Из окислительных энзимов в дрожжах известны каталаза и оксидаза, из редуцирующих – гидрогеназа. Биосинтез ферментов осуществляется по пути биосинтеза белков.

За последние годы достигнуты большие успехи в области изучения строения белков и нуклеиновых кислот: их относят в настоящее время к высокомолекулярным соединениям, макромолекулы которых достигают молекулярной массы от десятков тысяч до сотен миллионов и наделены сложнейшими функциями. Так, белки-ферменты осуществляют все химические реакции обмена веществ в клетке. Большинство ферментов клетки находится внутри органелл – ядра, митохондрий, рибосом, защищенных белковыми и липопротеиновыми мембранами и составляющих структуру клетки; биохимические процессы, протекающие в клетке, таким образом, локализованы. Так, продолговатые и крупные митохондрии клеток содержат ферменты окисления и фосфорилирования, небольшие круглые включения – рибосомы содержат ферменты, осуществляющие синтез белка.

Не менее сложными являются функции нуклеиновых кислот: так, дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) и рибонуклеиновая кислота (РНК) непосредственно осуществляют сам процесс синтеза белков, поэтому в процессе роста и размножения дрожжей нуклеиновые кислоты играют важную роль и количество их в протоплазме клетки возрастает с переходом дрожжей к росту и размножению.

По данным элементарного анализа, белок дрожжей содержит 15–18% азота, 6,5–7,3% водорода, 50–55% углерода, 21–24% кислорода, 0–2,4% серы. Основным показателем состава белка является именно аминокислотный состав макромолекул. За последние годы состав аминокислот в белке быстро определяется путем гидролиза белков и хроматографического анализа белкового гидролизата, что осуществляется автоматически специальными аппаратами через 2–4 ч.

Из опубликованных данных по определению в дрожжах тех аминокислот, которые в белковом комплексе дрожжей имеют главную

питательную ценность, видно, что в хлебопекарных дрожжах содержатся те же аминокислоты, как и в пивоваренных или в кормовых, но в несколько иных соотношениях (табл. 1).

Таблица 1 – Содержание аминокислот в дрожжах

Дрожжи	Количество азота в абсолютно сухих дрожжах, %	% к общему азоту						
		тирозин	триптофан	метионин	цистин	аргинин	гистидин	лизин
Пекарские № 1	8,60	1,82	1,10	1,73	0,88	9,13	3,90	8,96
Кормовые № 2	8,50	2,21	1,15	2,79	3,13	10,9	5,96	3,84
№ 3	8,82	2,26	2,49	-	3,14	12,64	4,39	-
Пивоваренные № 4	9,06	0,63	1,54	-	3,30	4,01	2,59	-

Примечание: №1 – пекарские дрожжи-сахаромицеты мелассовод-рожжевых заводов, №2 – кормовые дрожжи микоторула выращены на барде гидролизно-спиртовых заводов, №3 – кормовые дрожжи – торула выращены на древесных гидролизатах, №4 – пивоваренные дрожжи-сахаромицеты получены с пивоваренного завода.

5.3. Витамины дрожжей

Известно, что дрожжевые клетки богаты витаминами. Однако только в последние годы, благодаря развитию учения о витаминах и усовершенствованию методов их определения, выявилось содержание витаминов в дрожжах и их состав. Все дрожжи содержат витамины группы В и эргостерин – провитамин D. Соотношение отдельных компонентов витаминов комплекса В в различных дрожжевых грибах неодинаковое. Оно колеблется в широких пределах в дрожжевых грибах разного рода и зависит у одних и тех же дрожжей от условий их культивирования. Установлено, что дрожжевые клетки содержат витамин В₁ – тиамин, аневрин;

витамин В₂ – рибофлавин;

витамин В₃ – пантотеновую кислоту;
 витамин В₅, – РР – никотиновую кислоту.

Некоторые дрожжевые грибы розового цвета содержат бетакаротин – провитамин А. Витамины играют большую роль в биохимических процессах, свойственных дрожжевым клеткам. В настоящее время доказано, что многие витамины комплекса В составляют существенную часть ферментных систем.

Известно, что в ферментативных процессах углеводного обмена клеток важную роль играет витамин В. Установлено, что кокарбок-силаза, дериват аневрина, участвует в метаболизме пировиноградной кислоты. Ряд исследователей выявили химическую природу кофермента карбоксилазы, который оказался дифосфоаневрином. Он не только активизирует метаболизм пировиноградной кислоты, но и принимает участие в других биохимических процессах – в окислении и синтезе веществ протоплазмы. Рибофлавин (витамин В₂) входит в состав активной группы «желтого фермента» в виде фосфорного эфира. Он является компонентом окислительно-восстановительных ферментных систем. Работами Варбурга и Эйлера установлено, что витамин В₅ (никотиновая кислота) – составная часть козимазы; амид никотиновой кислоты – один из двух компонентов таких коферментных систем, как козимаза и кодегидраза, которые вместе с рибофлавином играют сопряженную роль в цепи окислительно-восстановительных реакций, в сложных реакциях клеточного дыхания.

Биологическая роль витамина В₆ (пиридоксина) еще точно не установлена.

Считают, что он участвует в ферментативных реакциях белкового обмена, а также осуществляет и синтез жиров. Пантотеновая кислота – витамин В₃ – обнаружена во всех растительных и животных клетках. Она стимулирует рост дрожжевых клеток так же, как и парааминобензойная кислота. Росту дрожжевых клеток способствуют биотин – витамин Н – и инозит, выделенные также, как и парааминобензойная кислота, из дрожжевых клеток.

Установлено, что биотин, инозит, пантотеновая кислота, аневрин, пиридоксин, никотиновая и аминокислоты являются факторами, стимулирующими рост и размножение дрожжевых клеток. Для одной расы требуются все перечисленные ростовые вещества, другие расы дрожжей могут размножаться в среде, содержащей только некоторые из этих ростовых веществ. Различные дрожжевые гри-

бы, выращенные на мелассовых растворах по воздушноприточному методу, содержат разное количество витаминов (табл. 2).

Таблица 2 – Количество витаминов

Дрожжи	Количество витаминов, мкг на 1 г сухого вещества				
	В ₁	В ₂	В ₅	эргостерин	биотин
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> раса 7 (хлебопекарные)	20	30	280	20000	32-54
<i>Candida tropicalis paca Mm</i> (кормовые)	10	75	355	25000	–

5.4. Жиры и углеводы дрожжей

Жиры дрожжей являются смесью истинных жиров (глицеридов жирных кислот) с фосфолипидами (лецитин, кефалин) и стеролами (эргостерол).

Жир дрожжей состоит, главным образом, из насыщенных кислот жирного ряда: пальмитиновой 75% и стеариновой 25%. Некоторые исследователи находят в дрожжах и другие кислоты – лауриновую и олеиновую. В состав жира дрожжей входит также неомыляемый жир – эргостерин – провитамин D.

В дрожжах содержится 35–40% углеводов к массе сухих дрожжей. Они входят в состав протоплазмы и оболочки дрожжевых клеток. Количество различных углеводов и значение их в дрожжевой клетке уточнены за последние годы благодаря применению новых методов их анализа – количественное определение с применением антрона и калориметрического анализа выделенных фракций.

В дрожжах содержатся полисахариды: гликоген, маннан – дрожжевая камедь – и глюкозан, который считали целлюлозой.

Маннан – дрожжевая камедь составляет 30% от общего числа углеводов, имеет комплексную структуру, включающую α-, d-маннозу. Он входит в состав клеточной оболочки и является составной частью протеинового комплекса, обуславливающего активность сахарозы в дрожжевой клетке: маннан не является запасным энергетическим веществом.

Гликоген дрожжей состоит из различных фракций, отличающихся растворимостью в щелочах и кислотах; некоторые из них – фракция,

растворимая в уксусной кислоте, являются запасными веществами клетки, другие – щелочная фракция и фракция, растворимая в хлорной кислоте, являются структурными элементами клетки.

В дрожжах содержится и диасахарид-трегалоза, как это издавна известно, по работам Коха, Мирбека. Это то же, как и одна из фракций гликогена, источник энергии в клетке; количество трегалозы в хлебопекарных дрожжах, полученных на мелассе, колеблется в широких пределах. Имеются небольшие количества и других углеводов в дрожжах – хитин, d-рибоза, роль которых еще не установлена.

Глюкан, маннан, гликоген, трегалозу следует считать нормальными компонентами дрожжевой клетки.

Содержание углеводов в хлебопекарных дрожжах, полученных на мелассе по воздушно-приточному методу

Углеводные фракции	% к сухому веществу
Трегалоza	8,6
Маннан	15,2
Глюкан	7,1
Гликоген	13,3
из них щелочерастворимый	1,4
растворимый в уксусной кислоте	7,3
растворимый в хлорной кислоте	4,6
Сумма углеводов	44,1

Однако неизвестно, с какими веществами глюкан, маннан и другие углеводные фракции связаны в живой клетке. Методы их деления таковы, что разрушают клетки и некоторые исследователи отрицают наличие этих углеводов в исходных клетках. Маннан и другие углеводы могут входить в состав белковых веществ, а гликоген может входить в состав эфирифосфорной кислоты.

Зола дрожжей составляет около 6–10% общей массы сухого вещества дрожжей. Состав золы колеблется в зависимости от условий их культивирования (табл. 3).

Состав золы колеблется в зависимости от условий их культивирования (табл. 3).

Зола дрожжей состоит примерно наполовину из фосфора; большая часть фосфорной кислоты связана в дрожжах с органическими соединениями. Общее количество P_2O_5 у сахаромикетов колеблется в пределах от 3,2 до 4,4% к сухому веществу. В дрожжевых клетках

обнаруживается конденсированным неорганический фосфор – пирофосфаты, состоящие из различного числа молекул ортофосфата.

Таблица 3 – Состав золы

Зольные вещества	Содержание, %	Зольные вещества	Содержание, %
K_2O	23,33-39,5	Fe_2O_3	0,06-07
Na_2O	0,5-2,26	P_2O_5	44,8-59,4
CaO	1,0-7,58	SO_3	0,57-6,38
MgO	3,77-6,34	SiO_2	0,92-1,88

Выделяют две фракции пирофосфатов, различных по полимерности: одна – кислоторастворимая составляет 80% к общему количеству полифосфатов, другая нерастворимая в кислотах составляет 20% и является физиологически более активной, чем первая. Обе фракции полифосфатов не обособлены в клетке. Они, по-видимому, находятся в свободном состоянии. В процессе жизнедеятельности дрожжевых клеток высокополимерные кислотонерастворимые фосфаты связываются с белками дрожжевых клеток и образуют полифосфат-нуклеиновые комплексы.

Калия в золе значительно больше, чем натрия, кальция и магния. Содержание серы у сахаромикетов, пекарских и пивных составляет 0,17–0,20%. Минеральные вещества, растворяясь в воде, играют большую роль в биодинамике протоплазмы клетки. Наиболее важное значение имеют катионы натрия, калия, кальция, магния, железа, анионы хлора, фосфора. Абсорбция ионов на поверхности белков обуславливает электрический заряд протоплазмы и придает ей главные физические свойства, характерные для протоплазмы как живой системы. Ионы, соединяющиеся химически с протеинами или с липоидами, имеют большое значение в процессах превращения этих веществ в протоплазме.

Вопросы

1. Каков элементарный состав дрожжей?
2. Каков состав ферментного комплекса дрожжей?
3. Какие витамины содержатся в дрожжах?
4. Каков состав жиров дрожжей?
5. Каков состав углеводов дрожжей?

Тема 6. Скорость роста дрожжей и факторы, влияющие на неё

- 6.1. Скорость роста дрожжей на мелассовых средах.
6.2. Влияние физико-химических факторов на рост и развитие дрожжей:
а) температуры;
б) активной кислотности рН;
в) концентрации питательных веществ и осмотического давления;
г) химических веществ;
д) интенсивности аэрации и перемешивания среды.
6.3. Выход дрожжей.

6.1. Скорость роста дрожжей на мелассовых средах

Известно много способов расчета скорости размножения микроорганизмов по формулам, облегчающим определение динамики накопления биомассы. Однако жизнедеятельность дрожжей тесно связана с условиями их выращивания, с изменчивостью их генеративной активности, поэтому математическими обобщениями невозможно полностью охватить биологические закономерности роста и размножения биомассы дрожжей, представляющую собой популяцию клеток разной степени зрелости с неодинаковой ферментативной активностью.

Интенсивность накопления биомассы характеризуется скоростью роста и размножения дрожжевых клеток. Скорость роста указывает на увеличение массы клеток, а скорость размножения – на частоту их почкования.

Для оценки скорости роста и размножения клеток используют относительную (удельную) скорость роста, которая представляет собой прирост биомассы за единицу времени.

Удельная скорость M определяется как логарифмом отношения количества биомассы m_1 , полученной за время t , к количеству дрожжей m_0 , засеянных в дрожжерастительный аппарат:

$$M = \lg m_1 / m_0 / t.$$

На практике удельная скорость роста дрожжей на мелассовом сусле колеблется от 0,05 до 0,37 ч⁻¹. Скорость роста дрожжей обусловлена применяемой расой и технологическим режимом, например, t , рН, подачей питательных веществ, количеством засевных дрожжей, продолжительностью процесса аэрации и т.д. Невысокая скорость роста дрожжей рекомендуется для получения дрожжей, предназначенных для сушки, а высокая для получения прессованной продукции.

Удельная скорость служит основанием для определения почасового расхода питательной среды, а так же продуктивности накопления биомассы.

Продуктивность Q выражается:

$$Q = M \cdot X,$$

где: Q – количество дрожжей получаемых за час с единицы объема аппарата $\text{kg}/\text{ч} \cdot \text{m}^3$; X – концентрация дрожжей kg/m^3 .

6.2. Влияние физико-химических факторов на рост и развитие дрожжей

Удельная скорость роста дрожжей при выращивании по воздушно-приточному способу может колебаться в широких пределах, это зависит от физико-химических факторов внешней среды t , рН, концентрации сухих веществ в среде, наличия в ней химических веществ, аэрации, перемешивания, физиологического состояния клеток и т.д.

а) *Температура.* Дрожжи относят к мезофильным микроорганизмам, температурный оптимум 26–33°C. В зависимости от расы от 20–36°C удельная скорость роста возрастает прямо пропорционально повышению температуры. При 36°C удельная скорость роста сахаромицетов резко падает и практически прекращается при 40°C, несакхаромицеты при этом продолжают рост. Подъемная сила хлебопекарных дрожжей наилучшая при t 30°C. Повышение t культивирования приводит к уменьшению выхода дрожжей в результате снижения влаги и в связи с этим массы других клеток, а так же вследствие размножения посторонних дрожжей и бактериальной микрофлоры. Инфицирующая микрофлора потребляет субстрат, предназначенный для дрожжей, и снижает выход сахаромицетов. Низкие t дрожжи не убивают, но приостанавливают их жизнедеятельность, наступает состояние анабиоза с последующим восстановлением нор-

мальных функций при наступлении благоприятных условий. В замороженном состоянии при минусовых температурах дрожжи могут храниться неограниченное время. Оттаивание и повторное замораживание их убивает.

б) Активная кислотность рН. Дрожжи сохраняют жизнеспособность в широких пределах колебания рН от 2,5–6,5. Оптимальная величина рН питательной среды для разных дрожжей 4,5–5,5. От величины активной кислотности среды зависит скорость поступления веществ в клетку, активность ферментов в синтезе белка, образование витаминов, следовательно, скорость роста других клеток. Рекомендуется в первые часы поддерживать рН 4,5–4,6, а к концу процесса повышать до 5,0–5,5, что обеспечивает высокий выход дрожжей и хорошую их подъемную силу. В период быстрого прироста биомассы и при использовании аммонийного азота рН резко понижается. В случае снижения рН ниже 4,0 необходимо при помощи аммиачного раствора подаваемого в дрожжевой аппарат вместо сернокислого аммония доводить рН до нормы. Чтобы предотвратить подщелачивание среды, подачу мелассовых и солевых растворов следует отрегулировать в соответствии со скоростью роста и размножения дрожжей.

в) Концентрация питательных веществ и осмотическое давление. Известно, что при прочих равных условиях скорость роста и размножения дрожжей зависит от усвоения питательных веществ, что в свою очередь обусловлено осмотическим давлением среды и концентраций клеточного сока. Осмотическое давление клеточного сока сахаромицетов от 0,8–0,12 МПа. Оно повышается при выращивание дрожжей в более концентрированных средах. Осмотическое давление культуральной среды увеличивается с ростом концентрации сухих веществ в ней, например, сахара или хлорида натрия и т.д.

Концентрация питательной среды в других продуктах характеризуют кратностью разбавления (кр), т.е. отношением единицы массы мелассы к количеству массы воды, в которой она растворена. Кратность разбавления мелассы влияет на выход и качество готовой продукции. В зависимости от стадии выращивания дрожжей готовят мелассное сусло различной кратности разбавления. Так, в начальных стадиях стремятся получить дрожжи физиологически активные, способные к быстрому размножению и сбраживанию углеводов. Поэтому их культивируют в мало разбавленных средах (кр 1:5; 1:7), при

слабой аэрации концентрирования сахара при этом разбавлении 5%. В этих условиях часть сахара тратится на образование этанола. В конечных стадиях стараются получить, возможно, больший выход дрожжей и поэтому выращивают в более разбавленных средах (кр 1:10; 1:17) при интенсивной аэрации. Содержание сахара в среде должно соответствовать скорости размножения дрожжей. С этой целью одновременно, а притоком по мере использования ее дрожжами. При соблюдении этого условия получают максимальный выход дрожжей.

г) Влияние химических веществ. Основное сырье производства - меласса, питательные соли сернокислый аммоний и диаммоний фосфат, а так же серная кислота и сернокислый магний, применяемые в дрожжевом производстве, иногда содержат вещества тормозящие рост и развитие дрожжевых клеток. К таким веществам можно отнести сернокислый ангидрид SO_2 , летучие кислоты, нитраты, образующие бактериями, окиси азота, фенол, сульфиды и сульфаты, фтор, мышьяк, серебро, медь и др. Попадая в культуральную среду, они либо тормозят размножения, либо прекращают жизнедеятельность дрожжевых клеток, что зависит от концентрации этих веществ в среде.

На скорость роста дрожжей так же отрицательно влияют дезинфицирующие вещества, применяемые в дрожжевом производстве. Например, формалин, применяемый для дезинфекции оборудования и коммуникаций 0,001%, приостанавливает рост дрожжей, а при содержании его в среде 0,05% клетки погибают. Антибиотики, применяемые для мелассы (биомицин и пенициллин 100мкг на 1000мл среды) не снижают активности дрожжевых клеток, хотя большинство бактерий при этом погибает.

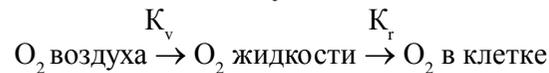
К веществам, активизирующим рост и размножение дрожжей и повышающим скорость их роста, относится кукурузный экстракт.

д) Влияние интенсивности аэрации и перемешивания на скорость роста дрожжей. Аэрация среды позволяет снабжать культуральную среду кислородом, необходимым для жизнедеятельности дрожжей. Другая клетка поглощает уже растворенный кислород как и все микроорганизмы. Растворимый кислород подавляет спиртовое брожение и активизирует процессы дыхания, при котором дрожжи получают достаточно энергии для биосинтеза. Торможение спиртового брожения кислородом называют эффектом Пастера, которая служит в другом производстве средством эффективного использования

сахара на синтез биомассы путем интенсивной аэрации в процессе культивирования.

Кислород относится к труднорастворимым газам. В культуральной среде дрожжерастворительного аппарата растворимость кислорода значительно меньше чем в воде. Скорость его растворения зависит от t , количества биомассы дрожжей, плотности, вязкости, поверхностного натяжения среды, наличия пеногасителей, интенсивности перемешивания и т.д.

Аэрируемую культуральную среду можно представить в виде системы состоящей из двух частей:



При этом процесс переноса кислорода воздуха в дрожжевую клетку состоит из двух этапов:

1) поглощение растворенного в жидкости кислорода клеткой характеризуется величиной K_r , которая характеризует потребность дрожжей в кислороде, необходимым для синтеза абсолютно сухого вещества (АСД). Размерность – г O_2 на 1 г АСД. Потребность дрожжей в кислороде составляет 1,0–1,25 г O_2 на 1 г АСД для молодых и от 0,75–1,06 для старых клеток;

2) растворение O_2 в жидкости характеризуется величиной K_v – коэффициент абсорбции или массопередачи, его размерность ($ч^{-1}$). Его величина характеризует интенсивность аэрации. Наибольшая скорость растворения кислорода наблюдается при наличии мелких пузырьков, когда увеличивается их поверхность соприкосновения с жидкостью. Массообмен интенсивней в момент образования пузырьков при перемешивании.

Из сказанного следует, что скорость растворения кислорода в культуральной среде не должна быть меньше скорости его потребления дрожжами. В этом случае будут созданы условия для нормального их роста.

6.3. Выход дрожжей

Если скорость роста дрожжей является количественной характеристикой процесса накопления биомассы, то его экономической характеристикой является коэффициент использования сырья или выход биомассы дрожжей. Выход дрожжей в % рассчитывают по формуле:

$$B = D \cdot 100/M,$$

где: M – количество израсходованного сырья; кг, D – количество полученных дрожжей, кг.

Выход дрожжей на разных дрожжевых заводах неодинаков, что зависит от конструкции оборудования, в основном аэрационной системы, технологической схемы, качества сырья, уровня автоматизации производства и пр.

Выход дрожжей на практике рассчитывают по отношению к мелассе с содержанием сахара 46% (M_{46}), при этом не принимается во внимание содержание СВ в дрожжах.

Вопросы

1. Какова формула расчета удельной скорости роста дрожжей?
2. Какова формула расчета продуктивности накопления биомассы?
3. Какие факторы оказывают влияние на скорость роста и размножения дрожжей?
4. Как отражается на скорости роста и размножения дрожжей изменение температуры среды?
5. Как влияет на скорость роста и размножения дрожжей рН среды?
6. Как сказывается на скорости роста и размножения дрожжей концентрация питательных веществ и осмотическое давление среды?
7. Какие вещества являются ингибиторами роста и размножения дрожжей, и какие вещества являются ростовыми?
8. Как влияет на скорость роста и размножения дрожжей интенсивности аэрации и перемешивания среды?
9. Как рассчитывается выход дрожжей?

Тема 7. Производство дрожжей различными способами

- 7.1. Производство дрожжей периодическими способами.
- 7.2. Производство дрожжей непрерывными способами.
- 7.3. Аппаратурно-технологическая схема производства дрожжей.
- 7.4. Требования ГОСТ к качеству прессованных хлебопекарных дрожжей.

7.1. Производство дрожжей периодическими способами

При выращивании дрожжей применяют бесприточный, воздушно-приточный и воздушно-проточный способы, различающиеся режимом подачи питательных веществ, воды, воздуха и продолжительностью процесса.

Бесприточный способ выращивания дрожжей или стационарный. Этот способ предусматривает подачу всех питательных веществ и воды при загрузке дрожжерастильного аппарата. Объем культуральной жидкости остается постоянным. Для бесприточных стадий характерны высокая концентрация среды и слабоаэрируемые условия. Культуральную среду либо аэрируют, либо воздух подают периодически в небольшом количестве на протяжении всего периода выращивания дрожжей. При бесприточном процессе среда вначале содержит все необходимые питательные компоненты, но по мере накопления биомассы дрожжей питательные вещества постепенно утилизируются и в среде накапливаются продукты обмена, вызывающие изменение физиологических свойств клеток. По окончании процесса дрожжи переводят в аппарат следующей стадии, со свежей питательной средой. По этому способу получают дрожжи в лабораторной стадии, в начальных стадиях чистой культуры (ЧК) и первую стадию дрожжей естественно-чистой культуры (ЕЧК).

В бесприточном процессе нельзя получить большое количество биомассы с высоким выходом из сырья. По этой причине в технологической схеме на заводах предусмотрен следующий этап периодического культивирования - воздушно-приточный.

Выращивание дрожжей по воздушно-приточному способу. Данный способ предусматривает выращивание дрожжей в одном

дрожжерастильном аппарате с постепенным притоком питательных веществ (мелассы, азот- и фосфорсодержащих солей) и постоянной аэрацией культуральной среды. Такой режим называют периодическим, так как он ограничен во времени. Продолжительность процесса в основном составляет 8–17 ч. Этот способ используют при получении дрожжей ЕЧК и ЧК, а также при выращивании товарных дрожжей.

Объем культуральной среды в аппарате и концентрация дрожжей на протяжении всего процесса не постоянны. В культуральной среде, несмотря на постоянный приток свежей питательной среды, к концу процесса накапливаются продукты жизнедеятельности клеток, тормозящие их рост, что отрицательно влияет на состояние клеток. Скорость роста дрожжей к концу процесса понижается. Периодические процессы, как правило, малопродуктивны.

При выращивании дрожжей по воздушно-приточному способу процесс проходит в три периода: первый период длительностью в 1 ч – *разбраживание дрожжей*; второй период длительностью от 7 до 14 ч – *накопление дрожжевой массы*; третий период длительностью от 0,5 до 1,5 ч – *дозревание дрожжей*.

В первый период прессованные задаточные дрожжи, поступающие в дрожжерастильный аппарат, переводятся из состояния покоя в состояние почкования. В протоплазме дрожжевых клеток происходят сложные биохимические процессы, связанные с перестройкой ферментативного комплекса клетки, что стимулируется созданием в момент складки дрожжей несколько более повышенных концентраций сахара, чем требуется для размножения дрожжей.

При смешивании дрожжей с питательной средой часть сахара моментально адсорбируется дрожжевыми клетками. Свежеполученные маточные дрожжи поглощают сахара значительно меньше, чем прессованные маточные дрожжи длительно хранившиеся: расход сахара в момент складки дрожжей составляет до 50% от общего количества сахара, заданного в дрожжерастильный аппарат перед подачей задаточных дрожжей. Спирта при этом в среде не обнаруживается.

Вертгейер установил, что одновременно с поглощением дрожжами глюкозы, сахарозы, левулезы происходит и убыль из среды фосфатов вследствие образования гексодифосфатов, которые в дальнейшем обеспечивают нормальную жизнедеятельность дрожжевой клетки.

К концу периода разбраживания оставшийся сахар расходуется на формирование молодых почек дрожжей. При микроскопировании проб бродящего сусла можно заметить изменение округлой конфигурации клеток. Одни дрожжевые клетки образуют молодую почку очень небольшого размера диаметром 1–2 мкм, у других наблюдается выпячивание протоплазмы в том месте, где должна появиться дочерняя клетка. (Протоплазма большинства дрожжевых клеток гомогенна и имеет лишь небольшое количество метахроматических включений).

Во втором периоде выращивания дрожжей начинается собственно рост дрожжевой массы. Мелассовое приточное сусло непрерывно, с возрастающей скоростью, поступает в дрожжерастильный аппарат и аэрируется большими количествами воздуха, вдуваемого в среду. В присутствии кислорода, растворенного в среде, и при наличии питательных веществ количество почкующихся дрожжевых клеток быстро увеличивается.

Расход маточных или засевных дрожжей составляет 15–35% к массе перерабатываемого сырья.

Увеличение дрожжевой массы обусловлено появлением все новых и новых поколений клеток. Таким образом, в дрожжерастильном аппарате общее количество дрожжевой массы сначала удваивается за счет появления новой генерации молодых, отпочковавшихся клеток. В последующие часы наблюдается бурное почкование всех дрожжевых клеток первой и второй генераций и дрожжевая масса снова удваивается. При этом дрожжевая биомасса состоит из дрожжевых клеток разных поколений: старых клеток первой генерации, дочерних клеток второй генерации и молодых клеток третьей генерации.

В последующие часы при выращивании по периодической схеме не наблюдается уже такого закономерного роста дрожжей, как в первые часы, культивирования их. Это обусловлено различными причинами: с одной стороны, в среде накапливаются дрожжевые клетки разных генераций, более молодые и более старые, способные и неспособные к дальнейшей вегетации; с другой стороны, абсолютное количество дрожжей в этот период настолько велико, что нарушается нормальное питание дрожжевых клеток. Главной причиной этого нарушения служит недостаток кислорода, растворимость которого в жидких средах весьма ограничена, а скорость насыщения среды кислородом лимитирована несовершенным устройством трубчатых воз-

духораспределительных систем. Кроме того, продукты жизнедеятельности дрожжей, накапливаясь в среде, тормозят рост дрожжевых клеток.

Все это приводит к тому, что в последующие часы дрожжевая масса накапливается медленнее.

При микроскопировании проб, взятых по ходу роста дрожжей, наблюдается бурное почкование дрожжей в период образования второй и третьей генераций. Позже, с накоплением в среде молодых клеток, количество почкующихся дрожжей уменьшается при работе, например, по 11-часовой схеме к 9-му и 10-му часу наблюдается почкование не у всех клеток, а лишь у 40–50% общего количества их, причем, часто величина дрожжевых клеток в это время неравномерна: у молодых дрожжевых клеток с гомогенной протоплазмой диаметр 4–5 мкм. Появляются также зрелые клетки диаметром 6–8 мкм с вакуолями, занимающими иногда большую часть дрожжевой клетки.

В третий период выращивания дрожжей происходит созревание дрожжевых клеток. К концу притока среды накапливаются дрожжевые клетки разных генераций; одни клетки к этому времени имеют небольшую дочернюю клетку величиной в 1/3 материнской, другие имеют дочернюю клетку, равную по величине материнской, но еще не отделившуюся; клетки более старых генераций в этот период заканчивают почкование, округляются и содержат одну или две небольшие вакуоли. В старых клетках одна большая вакуоль, занимающая почти 2/3 тела клетки. Общая поверхность дрожжевых клеток растет с увеличением их количества, скорость же диффузии питательных веществ тем выше, чем больше диффузионная поверхность.

Скорость притока мелассового сусла и питательных солей должна соответствовать скорости нарастания дрожжевой массы. При этом сахар и соли всегда должны находиться в среде в концентрациях, оптимальных для диффундирования в дрожжевую клетку.

Питательные соли, в процессе роста дрожжей, при работе по разным схемам усваиваются в соответствии с потреблением сахара. При наличии в среде кислорода и необходимого избытка азота и фосфора весь сахар может расходоваться на накопление дрожжевой массы. В зависимости от физиологического состояния и от соотношения процессов синтеза и распада белковых веществ, совершаю-

щихся в протоплазме клеток, происходит накопление или убыль общего количества азота в дрожжевых клетках.

В период интенсивного роста дрожжей азот и фосфор всегда находятся в среде избытке. Избыточное количество гарантирует лишь рост дрожжевой массы и не расходуется на побочные реакции, в то время, как избыточный сахар сбраживается в спирт. Концентрация сахара в среде при культивировании дрожжей не должна превышать 0,01–0,02%. Сахар, поступающий в среду притоком, непрерывно проникает в дрожжевую клетку и расходуется в присутствии кислорода на построение протоплазмы дрожжей, а избыток его – на образование спирта. Спирт выделяется клеткой в окружающую среду, накапливается его тем больше, чем выше была избыточная концентрация сахара в среде. В разные периоды роста дрожжей удается обнаружить спирт в бродящем сусле в количестве от 0,01 до 0,15%. При отклонениях от нормального режима притока среды концентрация спирта может достигать 0,5–0,7%.

При выращивании дрожжей по воздушно–приточному способу спирт и сахар потребляются дрожжами одновременно, поэтому при исследовании проб, взятых из бродильного чана по ходу роста дрожжей, улавливаются лишь остатки спирта, использованные дрожжами. Часть спирта уносится воздухом, проходящим через среду.

7.2. Производство дрожжей непрерывными способами

При этом способе дрожжи выращивают с постоянной аэрацией культуральной среды, постепенным притоком питательных веществ в дрожжерастильный аппарат и одновременным оттоком культуральной среды в отборочный аппарат, т.е. дрожжи выращивают в проточной среде с постоянной концентрацией питательных веществ и с постоянной концентрацией биомассы в дрожжерастильном аппарате. Этот процесс называют непрерывным. Он протекает в двух дрожжерастильных аппаратах (основном и отборном) и включает в себя два периода: накопительный и проточный (отточный).

Первый основной дрожжегенератор используется для непрерывного накопления биомассы, в него непрерывно поступает питательная среда и осуществляется ее аэрация. Из основного аппарата содержимое непрерывно вытекает во второй, где происходит созревание дрожжей в условиях небольшой аэрации без дополнительного

питания. Из второго аппарата бражка с дрожжами передается на сепараторы. В основном аппарате задаточные дрожжи в первом периоде в течение 5–7 ч накапливают максимально возможное количество дрожжевой массы, после начинается непрерывный отток среды во второй аппарат. В первом периоде выращивания дрожжей при этом сохраняются приведенные выше биологические закономерности накопления биомассы до начала оттока среды. Однако рост и размножение дрожжей при непрерывном оттоке и притоке питательной среды имеет свои особенности.

Морфология, химический состав и ферментативные системы дрожжей-сахаромицетов зависят от условий питания, аэрации и других физико-химических факторов среды; при выращивании дрожжей в проточных непрерывно обновляемых средах можно стабилизировать физиологическое состояние дрожжевых клеток в желательной фазе – логарифмического роста.

Большое количество проведенных экспериментов показывает возможность прироста дрожжей с постоянной удельной скоростью в заданных пределах от 1,1 до 1,20 ч⁻¹. При выращивании их гомогенно-непрерывным методом, когда среда дрожжерастильного аппарата непрерывно перемешивается вдуваемым воздухом и сохраняет однородный состав для поддержания намеченного постоянного количества дрожжей в основном дрожжерастильном аппарате (в единице объема среды), скорость прироста биомассы должна соответствовать скорости оттока бражки с дрожжами. Это и предопределяет производительность товарного дрожжерастильного аппарата.

В связи с этим важно установить максимально возможную скорость прироста биомассы дрожжей, состоящей из клеток разного состава, воспроизводящих дочерние клетки с неодинаковой скоростью, но дающей ежечасно постоянный суммарный прирост биомассы.

Наблюдения за скоростью роста и размножения как задаточных дрожжей, поступивших в основной аппарат в момент его заполнения, так и дрожжей, выращенных в этом аппарате до момента перехода на непрерывный отток среды, позволили выявить ряд закономерностей, существенных для определения физиологического состояния дрожжей, способных к длительному максимально возможному приросту.

Что бы более полно представить физический смысл скорости роста дрожжей пользуются показателем часового прироста дрожжей.

Если известна удельная скорость, то величину часового прироста находят по таблице антилогарифмов. Например, удельной скорости роста равной $0,57 \text{ ч}^{-1}$ по таблице антилогарифмов соответствует число 1,17, которое является коэффициентом часового прироста дрожжей.

При засеве первого дрожжерастильного аппарата специально подготовленными задаточными дрожжами в первые часы происходит синхронное отпочковывание дочерних клеток с замедленной скоростью: почасовой прирост дрожжевой массы составляет 1,08–1,10, затем ускоряется и к 5-му и 6-му часу прирост биомассы характеризуется коэффициентами 1,2–1,25. К этому времени в среде накапливаются дрожжевые клетки, различные как по величине, так и по скорости образования дочерних клеток.

Если сопоставить размеры дрожжевых клеток, их генеративную активность и скорость новообразования дочерних клеток, то можно выявить различные в скорости прироста биомассы между дрожжевыми клетками задаточной культуры и дрожжами, выращенными в дрожжерастильном аппарате по воздушно-приточному режиму, подготовленными для непрерывной стадии процесса.

Углубленное изучение состава популяции дрожжей позволило выявить морфофизиологические особенности дрожжевых клеток, входящих в состав биомассы.

К моменту непрерывного оттока среды в состав биомассы входят дрожжевые клетки, различные как по размеру, так и по генеративной способности. Генеративная активность дрожжевых клеток в основном аппарате характеризуется данными, приведенными в таблице 4.

Таблица 4 – Генеративная активность дрожжевых клеток

Группа дрожжевых клеток	Диаметр клеток, мкм	Объем 100 клеток, мкм	Соотношение клеток, %	Коэффициент размножения	К – скорость роста
1	7-8	8500	20	3,0	1,24
11	5-6	7000	45	1,7	1,16
111	3-4	5000	35	1,0	1,08

Соотношение дрожжевых клеток разного размера в процессе накопления биомассы изменяется в зависимости от состава питательной среды и степени ее аэрации. В связи с этим изменяются и ее ферментативные свойства: зимазная, мальтазная, дыхательная и генеративная активность. Удельный прирост биомассы может существенно изменяться – колеблется в пределах 1,10–1,18.

Устойчивая скорость прироста биомассы на полноценных меласовых растворах характеризуется в стадии непрерывного потока коэффициентом 1,15–1,16.

Таким образом, гомогенонеперывный способ производства хлебопекарных дрожжей приводит к длительному сохранению однородного состояния биомассы, представляющей собой популяцию дрожжевых клеток, закономерно проходящих свойственный им повторяющийся цикл развития.

Из основного дрожжерастильного аппарата непрерывно оттекает бражка в количестве, соответствующем скорости прироста биомассы, она поступает во второй дрожжерастильный аппарат, где происходит дозревание дрожжей.

Для получения полноценных стойких прессованных хлебопекарных дрожжей, длительно хранящихся, необходимы стабилизация протеолитических ферментов, завершение почкования клеток и их созревание. Это наблюдается при дозревании их в условиях небольшой аэрации, без добавок питательной среды утилизируются трудноусвояемые редуцирующиеся вещества, понижается их остаточное количество в бражке и дополнительно накапливается до 10% биомассы к общему количеству ее в аппарате.

В процессе дозревания происходит как синтез веществ, так и распад их: общее количество азота и фосфора в биомассе понижается. В зависимости от длительности дозревания дрожжей (от 30 до 120 мин) и от температуры, поддерживаемой в среде, содержание азота в готовой продукции может уменьшаться с 9,8 до 8,2% (на сухое вещество).

Таким образом, дрожжи, выращиваемые в основном аппарате, отличаются способностью быстро расти и размножаться с постоянной установленной скоростью и требуют определенного режима питания и аэрации, причем иного, чем те же дрожжи во втором аппарате, предназначенном для выработки готовой продукции.

Первые характеризуются активностью ферментных систем, вторые должны отличаться стабильностью ферментов, стойкостью при хранении, осмоустойчивостью. В оптимальных условиях и должной скорости потока среды дрожжерастильный аппарат первой фазы процесса полностью обновляется через 6–7 ч, аппарат второй фазы полностью обновляется через 1,5–2 ч, таким образом, для непрерывного процесса выращивания хлебопекарных дрожжей требуется два дрожжегенератора с соотношением их емкостей 3:1.

7.3. Аппаратурно-технологическая схема производства дрожжей

Технологический процесс производства дрожжей состоит из следующих основных стадий:

- прием, хранение и гомогенизация мелассы;
- приготовление питательной среды;
- выращивание маточных и товарных дрожжей;
- выделение, формовка и упаковка прессованных дрожжей;
- сушка и упаковка сушеной продукции.

Принципиальная аппаратурно-технологическая схема получения хлебопекарных дрожжей представлена на рис. 1.

Прием, хранение и гомогенизация мелассы. Меласса поступает на завод в железнодорожных цистернах 1 и через сливную воронку, расположенную между рельсами, сливается в приемный резервуар 2. С помощью шестеренчатого насоса 3 меласса перекачивается в хранилище 4. Состав мелассы непостоянен. При хранении она расслаивается, что затрудняет ее переработку. Поэтому производят гомогенизацию мелассы путем многократного перекачивания или перемешивания сжатым воздухом в гомогенизаторе 5, рассчитанном на 2–3-недельный запас. После усреднения состава мелассы с помощью шестеренчатого насоса 6 меласса перекачивается в напорный бак 7, расположенный на весах 8.

Приготовление питательной среды. В дрожжевом производстве питательной средой являются осветленный раствор мелассы и растворы питательных солей и ростовых веществ, обеспечивающие растущие клетки всеми необходимыми компонентами, их быстрый рост и размножение.

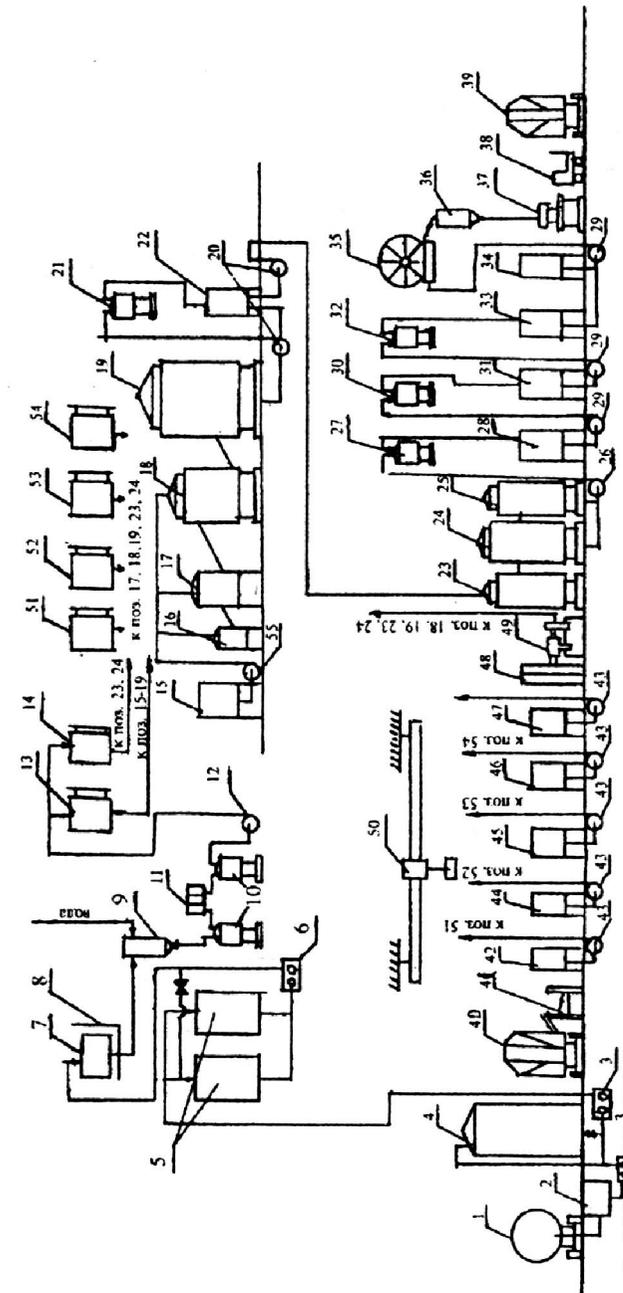


Рис. 1. Принципиальная аппаратурно-технологическая схема получения хлебопекарных дрожжей

Приготовление мелассового сусла. Приготовление раствора мелассы состоит в разбавлении ее до заданной концентрации водой, антисептировании или стерилизации и осветлении. Взвешенную мелассу из бака 7 разбавляют водой в соотношении от 1:1 до 1:4 в рас-сиропнике 9.

В разбавленную мелассу добавляют антисептик и после тщательного перемешивания выдерживают 30–40 мин.

Затем при включенной мешалке рН разбавленной серной кислотой доводится до 4,5–5,5 и производится осветление на кларификаторе 10. При наличии оборудования для стерилизации мелассы производится термообработка мелассового раствора в пастеризаторе 11 при 85–90 °С и стерилизаторе при 105–125 °С. Затем он охлаждается до 20 °С и отправляется на второй кларификатор. С помощью насоса 12 мелассовое сусло направляется в напорные мерники 13 и 14. Из сборника 13 мелассовое сусло дозируют в аппарат чистой культуры, а из сборника 14 – в аппарат товарной стадии.

Приготовление минерального питания. Питательные соли поступают на завод в железнодорожных вагонах 40 и хранятся в складе для химикатов 41. По мере необходимости готовят растворы солей в заторных аппаратах 42, 44, 45, 46. Для каждого раствора соли используется отдельный аппарат. Заторные аппараты снабжены мешалкой, устройством для приёма солей, коммуникациями для подачи воды и удаления осветленных растворов солей. Загрузка аппаратов осуществляется при помощи электротельфера 50.

Растворы сернокислого аммония и диаммонийфосфата готовят 10–20 %-й концентрации, а растворы хлористого калия и сернокислого магния – 10 %-й концентрации.

Прозрачные растворы с помощью насосов 43 перекачивают в приточные мерники 51–54 и дозируют в дрожжерастильные аппараты в соответствии с технологическим режимом.

В современном дрожжевом производстве засевные дрожжи готовят из чистой культуры дрожжей на косом агаре. Обычно 3–5 стадий проводят в лабораторных условиях, затем следуют 2–3 стадии в аппаратах 16, 17 (см. рис. 1) в цехе чистых культур и, наконец, ряд стадий осуществляется в производственной аппаратуре 18, 19.

В последнее время наибольшее распространение получил трехступенчатый режим сепарирования дрожжей.

Дозревшие дрожжи из аппаратов 24, 25 (см. рис. 1) с помощью насоса 26 поступают на I ступень сепарирования.

7.4. Требования ГОСТ Р54731-2011 к качеству прессованных хлебопекарных дрожжей

Хлебопекарные прессованные дрожжи должны быть изготовлены в соответствии с требованиями настоящего стандарта по технологическим регламентам и инструкциям, с соблюдением требований и норм, установленных нормативными правовыми актами Российской Федерации. По органолептическим показателям хлебопекарные прессованные дрожжи должны соответствовать требованиям, указанным в таблице 5.

Таблица 5 – Органолептические показатели

Наименование показателя	Характеристика	Метод испытаний
Внешний вид	Плотная масса, легко ломается и не мажется	По 8.2
Цвет	Равномерный, без пятен, светлый, допускается сероватый, кремоватый или желтоватый оттенок	По 8.2
Вкус	Пресный, свойственный дрожжам, без постороннего привкуса	По 8.3
Запах	Свойственный дрожжам	По 8.3

По физико-химическим показателям дрожжи хлебопекарные прессованные должны соответствовать требованиям, указанным в таблице 6.

Таблица 6 – Физико-химические показатели

Наименование показателя	Значение показателя		Метод испытаний
	сорт «высший»	сорт «первый»	
1	2	3	4
Массовая доля сухого вещества, %, не менее	27	25	По 8.4-8.6
Подъемная сила дрожжей в день выработки, мин, не более	50	60	По 8.7, 8.8

Продолжение таблицы 6

1	2	3	4
Кислотность дрожжей в пересчете на уксусную кислоту в день выработки, мг на 100 г дрожжей, не более	55	90	По 8.9
Кислотность дрожжей на 30-е сутки хранения при температуре от 0°С до 4°С в пересчете на уксусную кислоту, мг на 100 г дрожжей, не более	320	-	По 8.9
Кислотность дрожжей на 12-е сутки хранения при температуре от 0°С до 4°С в пересчете на уксусную кислоту, мг на 100 г дрожжей, не более	-	300	По 8.9
Стойкость, ч, не менее	72	60	По 8.10

Вопросы

1. Каковы особенности выращивания дрожжей бесприточным способом?
2. Выращивание дрожжей воздушно-приточным способом.
3. Какие фазы развития проходит биомасса дрожжей в процессе ферментации?
4. Опишите аппаратно-технологическую схему производства дрожжей.

Тема 8. Выделение дрожжей

- 8.1. Отделение дрожжей от бражки и промывание.
- 8.2. Прессование дрожжей.
- 8.3. Формование и упаковка дрожжей.
- 8.4. Сушка дрожжей.

8.1. Отделение дрожжей от бражки и промывание

Дрожжевой клетке, как и всем микроорганизмам, присущи 4 основные фазы роста и развития: 1 – лаг-фаза, 2 – фаза логарифмического роста, 3 – стационарная фаза и фаза отмирания. Однако процесс выращивания хлебопекарных дрожжей предусматривает только первые 3 фазы. Стационарная фаза в дрожжевом производстве соответствует этапу дозревания клеток. Если от правильности ведения процесса в лаг-фазу и фазу логарифмического роста зависит выход дрожжей, то от стадии дозревания зависит больше качество готовой продукции. Так, например, сепарирование недозрелых дрожжей ведет к обильному пенообразованию, а при формовании таких дрожжей образуются трещины. В период дозревания образование новых клеток практически прекращается, заканчивается также и почкование, так как питательные вещества в дрожжерастильный аппарат не поступают. Для поддержания жизнедеятельности клетки используют оставшиеся в питательной среде вещества. В стадии дозревания ферментные системы клеток перестраиваются с активного синтеза биомассы на процессы обмена, поддерживающие их жизнедеятельность, при этом устойчивость клеток к условиям окружающей среды значительно повышается. При непрерывном способе культивирования дозревание осуществляется в отборочном аппарате, а при периодическом в основном дрожжегенераторе.

В процессе дозревания дрожжевые клетки увеличиваются в размерах, масса их возрастает. Прирост биомассы в этой фазе может составлять 5–10 % от массы дрожжей, накопленных в логарифмической фазе.

В созревших клетках ферментные системы уравновешены. Такие клетки при определенных условиях могут долго сохранять при-

сущие им свойства, поэтому процесс созревания должен обеспечить максимальное число зрелых клеток (почкование должно завершиться). Особенно большое значение режим созревания дрожжей приобретает при работе по воздушно-проточному способу, так как в отборочный аппарат все время поступают клетки с активной ферментной системой, направленной на синтез биомассы. В процессе созревания клетки потребляют остаточные питательные вещества. Завершается процесс почкования. Отпочковавшиеся клетки вырастают, и биомасса увеличивается в основном за счет роста клеток.

По истечении срока созревания культуральная среда должна направляться на сепараторы, где под влиянием центробежной силы жидкость делится на два потока с разным удельным весом. Длительное пребывание дрожжей в бражке сопровождается усилением протеолитической активности ферментов клетки, при этом ухудшается подъемная сила и стойкость дрожжей. Выделенные с помощью сепараторов дрожжи промывают холодной водой, сгущают на сепараторах и получают дрожжевое молоко (концентрат с содержанием от 450 до 700 г дрожжей/литр).

В последнее время наибольшее распространение получил трехступенчатый режим сепарирования дрожжей. Созревшие клетки из отборочного аппарата с помощью насоса поступают на первую ступень сепарирования. Здесь 75–80% культуральной среды (обездрожженной бражки) отделяют от дрожжей, а 20–25% непромытых дрожжей направляют в сборник после первой ступени сепарирования, куда подается примерно двукратный объем холодной хлорной воды (1–2°C). С помощью насоса дрожжевой концентрат направляют на 2-ю ступень сепарирования, где дрожжи отделяют от промывной воды и частично промывают, промывные воды сбрасывают в канализацию (75–80%), а дрожжи направляют в сборник дрожжей на 2-й ступени сепарирования. В этот сборник так же подают воду для окончательной промывки дрожжей и с помощью насоса подают на 3-ю ступень сепарирования. В сепараторах 3-й ступени происходит сгущение дрожжей до концентрации 450–700 г дрожжей/литр. С целью сокращения потерь при сепарировании промывные воды с 3-й ступени направляют в сборник дрожжей после 1-й ступени сепарирования. Время сепарирования не должно превышать 2-х часов. Для получения дрожжей хорошего качества целесообразно использовать для промывки воду $t=2^{\circ}\text{C}$, а во время сепарирования поддерживать следующую t в

сборниках: после 1-й ступени сепарирования 22–25 °C, после 2-й 11–15 °C, а после 2-й 6–8 °C. В связи с этим, сборник дрожжей после 3-й ступени сепарирования должен содержать змеевик с рассольным охлаждением. Затем дрожжевой концентрат поступает в сборник для хранения с $t=2-4^{\circ}\text{C}$, что способствует замедлению автолитических и протеолитических процессов. При низкой t дрожжи длительно сохраняют ферментативную активность и при быстром последующем формовании и прессовании не нагреваются выше 10 °C, даже в теплое время года.

8.2. Прессование дрожжей

Прессованием принято называть выделение дрожжей из суспензии под давлением на фильтр-прессах или под вакуумом на вакуум-фильтрах. Из дрожжевого молока дрожжи на небольших заводах выделяют прессованием на фильтр-прессах, которые устроены следующим образом. На стальных стойках, покоящихся на прочном фундаменте, установлены съемные рифленные чугунные плиты и полые рамы. Между каждыми двумя смежными плитами одна рама, на которую навешивают фильтрующую хлопчатобумажную ткань. Плиты зажимают заключительными головными плитами, из которых задняя неподвижная, а передняя может двигаться вперед и назад. Для стягивания пресса применяют механические или гидравлические зажимы, приводимые в действие гидравлическими насосами, которые работают от двигателя и рассчитаны на давление от 150 до 300 атм. Фильтр-прессы имеют большей частью квадратное или прямоугольное строение. Число рам и плит, в зависимости от величины фильтр-пресса, колеблется от 30–50. Подача дрожжевого концентрата в фильтр-пресс осуществляется при помощи вихревого насоса, обеспечивающего равномерное наполнение пресса. Концентрат движется по каналу, расположенному в центре пресса или в специальных карманах, из которых через соответствующие отверстия поступает в полые рамы. Прессование длится от 30 мин до 2 часов и более. По окончании прессования фильтр-пресс открывают вывинчиванием зажимного винта, после чего раздвигаются плиты и рамы. Дрожжи, отложившиеся на ткани в виде плотной лепешки, выпадают большей частью сами собой в чистый металлический ящик, а остатки дрож-

жей удаляют с ткани металлическими лопаточками. Влажность дрожжей извлеченных из пресса составляет 71–74%. Производительность от 200 до 1200 кг за одно наполнение. Схема фильтр-пресса представлена на рис. 2.

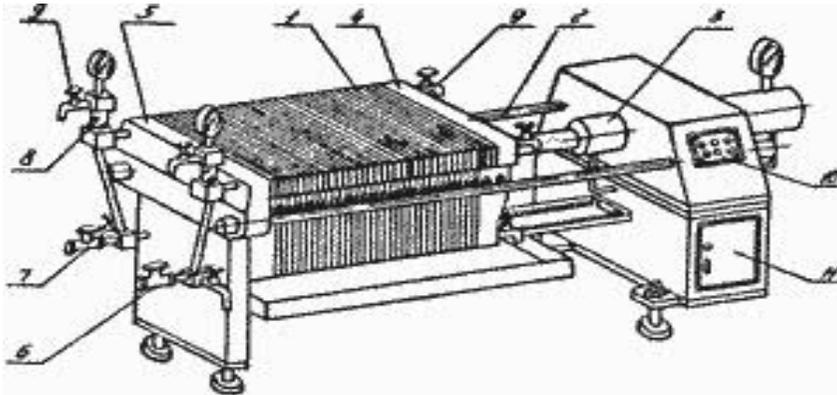


Рис. 2. Схема фильтр-прессов ФКО 10; 15; 20; 25

Фильтр-пресс состоит из набора плит и рам 1, которые опираются на горизонтальные балки 2 и уплотняются с помощью гидравлического зажимного устройства 3 между нажимной 4 и упорной 5 плитами.

В качестве фильтрующего элемента используется фильтровальный картон или фильтровальные салфетки из других материалов, которые устанавливаются между плитами и рамами на привалочные поверхности и одновременно служат уплотняющими прокладками. Уплотнение отводящих и подводящих клапанов обеспечивается манжетами из пищевой резины.

На крупных предприятиях, где вырабатывают более 15 тонн пресованных дрожжей в сутки, их впрессовывают на вращающихся барабанных вакуум-фильтрах. Процесс выпрессовывания может осуществляться непрерывно, производительность вакуум-фильтров 100–1200 кг в час. Его основными частями являются: фильтрующий барабан с пустотелым валом, корпус, состоящий из 2-х труб, сборник дрожжевого концентрата, распылители-форсунки, нож с направляющим лотком, механический привод с электродвигателем и 2 вакуум-насоса.

На рис. 3 показан барабанный вакуум-фильтр, основной частью которого является барабан 1 с полый цапфой 2. К цапфе прилегал распределительная головка 3, отверстия которой против ячеек в цапфе открывают доступ из секторов барабана в камеры головок. В корыте 5 фильтра установлена мешалка 6 для размешивания суспензии. Специальное устройство 7 служит для затирания трещин, образующихся в слое осадка.

Поверхность фильтрации барабанных вакуум-фильтров обычно равна 5–40 м².

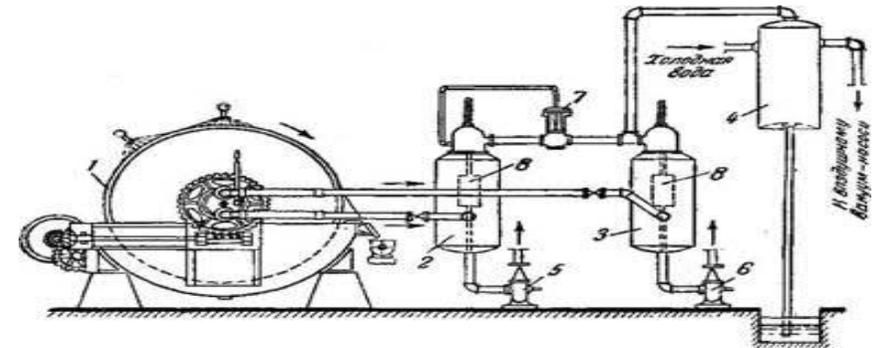


Рис. 3. Схема установки вакуум-фильтра:

1 – вакуум-фильтр; 2 – сборник для основного фильтрата; 3 – сборник для промывных вод; 4 – барометрический конденсатор; 5, 6 – центробежные насосы; 7 – автоматический клапан; 8 – поплавки

Подготовленный и охлажденный дрожжевой концентрат из сборника центробежным насосом перекачивается в промежуточный сборник вакуум-фильтра. Во время пуска и в период работы в нем поддерживается максимальный уровень дрожжевого концентрата. Под действием вакуума дрожжевые клетки присасываются к фильтрующей ткани вращающегося барабана, образуя по всей поверхности плотный слой дрожжей. Отсасываемая бражка и промывная вода вакуум насосами непрерывно направляется в соответствующий сборник, откуда жидкость перекачивается на сепараторы первой ступени. Таким образом, технологическая схема предусматривает возврат мелких дрожжевых клеток, попавших в бражку при фильтрации, что практически ликвидирует потери дрожжей.

8.3. Формование и упаковка дрожжей

Обезвоженные дрожжи из приемного люка вакуум фильтра или из под пресса поступают на транспортерную ленту и направляются либо в сушильное отделение, либо в бункера тестосмесителя или в бункера формовочной машины.

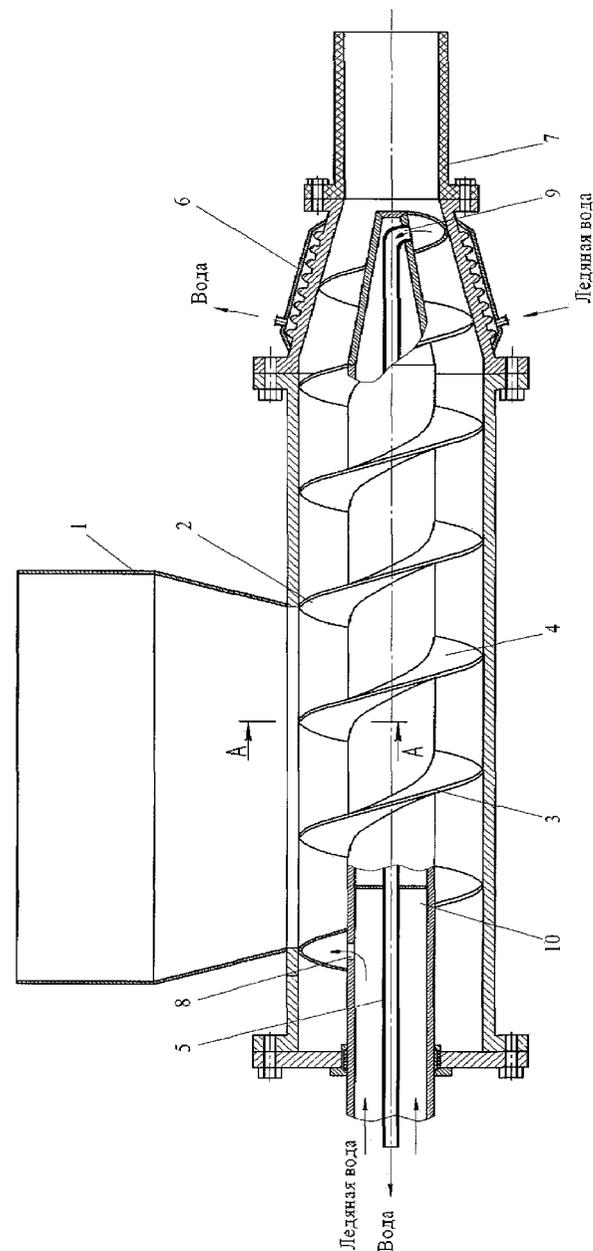
Для отпуски дрожжей потребителю, пастообразную дрожжевую массу формуют в виде прямоугольных брусков массой 1000 г, 500 г, 100 г, 50 г и заворачивают в специальную бумагу. Формование и фасовку прессованных дрожжей осуществляют на автоматических линиях. На рис. 4 представлено формовочное устройство.

Формовочное устройство содержит: бункер 1, рабочую камеру 2, полый шнек 3 с полыми витками 4, трубу 5, охлаждающую рубашку 6 предматричного участка рабочей камеры, матрицу 7, отверстия 8 для входа ледяной воды и 9 для выхода отработанной воды, заглушку 10.

Процесс охлаждения проводят следующим образом. Выделенная на вакуум-филт্রে дрожжевая масса с температурой 6°С поступает в бункер 1, из которого – в рабочую камеру 2. Здесь дрожжевая масса захватывается шнеком 3 и выпрессовывается через матрицу 7. В процессе перемещения дрожжей в рабочей камере давление повышается и достигает максимального значения в предматричном участке рабочей камеры, вследствие чего дрожжи нагреваются. С целью исключения повышения температуры дрожжей от них непрерывно отводится теплота ледяной водой с температурой 1–2°С. Последняя подается по кольцевому зазору, образованному полым шнеком 3 и трубой 5 и ограниченному заглушкой 10. Ледяная вода проходит последовательно через полости всех витков 4, имеющих большую поверхность контакта с дрожжами, которые эффективно охлаждаются. Отработанная вода отводится через отверстие 9 по трубе 5. Подача ледяной воды и отвод отработанной производится через вращающийся шнек 3 с прикрепленной к нему трубой 5 посредством специального распределительного устройства (не показано).

Одновременно отвод теплоты от дрожжей в предматричной зоне отводится ледяной водой, проходящей через рубашку 6.

Таким образом, одновременный отвод теплоты ледяной водой по всей длине формовочного устройства с помощью шнека и в предматричной зоне с помощью охлаждающей рубашки позволяет эффективно охлаждать дрожжи, которые на выходе из устройства имеют конечную температуру 2–4°С.



Фиг. 1

Рис. 4. Формовочное устройство

Выходящая из матрицы монолитная дрожжевая лента подхватывается транспортером и периодически действующим ножом нарезается на бруски соответствующего готовой продукции размера. Бруски прессованных дрожжей подаются в упаковочную машину, где обертываются в бумажку. На упаковке указывается дата изготовления, данные о производителе, срок и условия хранения.

Упакованные дрожжевые бруски укладывают в чистые, сухие ящики. Общая масса дрожжей в одном ящике не должна превышать 12 кг. Дрожжи – быстро портящийся продукт, поэтому хранение производят при температуре 1–4 °С и относительной влажности 82–96%. Понижение температуры способствует замедлению процессов жизнедеятельности в дрожжевой клетке и лучшему их сохранению. Более низкая температура затормаживает размножение и развитие сопутствующих бактерий (уксуснокислых, молочнокислых, масляных и гнилостных), которые в результате своей жизнедеятельности выделяют в среду ядовитые вещества, угнетающие дрожжевые клетки. Прессованные дрожжи перевозят на большие расстояния в вагонах холодильниках и авторефрижераторах при температуре 14 °С.

8.4. Сушка дрожжей

Это процесс, во время которого удаляется влага из дрожжевой клетки. Дрожжи обычно содержат 67–75% влаги, которая распределяется либо в межклеточных пространствах (межклеточная), либо внутри клетки (внутриклеточная). Соотношение меж- и внутриклеточной влаги различно и зависит от общей влажности дрожжей: чем выше общая влажность дрожжей, тем больше в клетке содержится внеклеточной влаги, и наоборот. Например, при общей влажности дрожжей 70% в клетке содержится 6,25% внеклеточной влаги и 63,75% внутриклеточной. При общей влажности 75% в клетке содержится 21,87% внеклеточной влаги и 53,13% внутриклеточной (данные приведены по Уайту).

Внутриклеточная влага включает в себя влагу, находящуюся в свободном и связанном виде. Во время сушки, в первую очередь, удаляется межклеточная влага и лишь после этого удаляется внутриклеточная влага (сначала свободная, а затем связанная).

Процесс сушки дрожжей можно разбить на три периода.

В первом периоде общая влажность дрожжей снижается с 68–75 до 50%. При этом происходит интенсивное удаление межклеточной влаги, и масса дрожжей охлаждается, поэтому температура воздуха, подаваемого в сушилку, в этом периоде может быть высокой (65–90 °С), и это не влияет существенно на дрожжевую клетку.

Во втором периоде общая влажность дрожжей снижается с 50 до 16–18%. При этом удаляется свободная внутриклеточная влага. Скорость сушки замедляется, и дрожжи начинают нагреваться, поэтому температура воздуха, подаваемого в сушилку, должна быть снижена до 55–63 °С во избежание перегрева дрожжей, вследствие которого снижается активность ферментов и ухудшается качество продукта.

В третьем периоде сушки общая влажность дрожжей снижается с 16–18 до 8–10%. При этом удаляются остатки свободной внутриклеточной влаги и части связанной внутриклеточной влаги. Скорость сушки замедляется еще больше, так как связанная влага удаляется с трудом, и дрожжи нагреваются более интенсивно. В связи с этим температура воздуха, подаваемого в сушилку, должна быть снижена до 30–40 °С, чтобы дрожжи не перегревались и не ухудшалось качество сушеных дрожжей. Температура массы дрожжей не должна превышать 30–32 °С. Указанные выше интервалы температуры воздуха по периодам сушки даны для сушилок разной конструкции и различных режимов сушки. Существуют три режима сушки: мягкий, средний и жесткий, что обусловлено температурой воздуха, подаваемого в сушилки (табл. 7).

Таблица 7 – Режимы сушки дрожжей

Период сушки	Режим сушки дрожжей					
	жесткий		средний		мягкий	
	Температура воздуха, °С	Остаточная влажность дрожжей, %	Температура воздуха, °С	Остаточная влажность дрожжей, %	Температура воздуха, °С	Остаточная влажность дрожжей, %
I	65–55	50	65–55	60	50–40	50
II	55–45	16	45–40	16	40–30	16
III	45–40	8	38–35	8	30–25	8

Режим сушки выбирают в зависимости от конструкции сушилки и физиологического состояния дрожжевых клеток. Жесткий режим рекомендован для сушилок ВИС-42Д, а средний и мягкий – АІ-ВГС (ВНИЭКИпродмаш) и сушилок флюидизационного типа фирмы «Прессиндустрия». Дрожжи с содержанием трегалозы более 10% СВ и азота не более 1,6% можно сушить по любому режиму; дрожжи с содержанием трегалозы 7–10% СВ и азота 1,7–1,9% – по среднему и мягкому режимам; дрожжи с содержанием трегалозы до 7% СВ и азота до 2,0% и более – только по мягкому режиму. Только при этом сохраняется их ферментативная активность.

Самая короткая продолжительность процесса высушивания дрожжей у жесткого режима. Этот режим является наиболее производительным, однако не всегда получается хорошее качество сушеного продукта. Лучшее качество обеспечивает сушка в виброкипящем слое (сушилки АІ-ВГС и фирмы «Прессиндустрия»). Процесс сушки протекает непрерывно в течение 2,5–3,0 ч.

Упаковка и хранение сушеных дрожжей. Сушеные дрожжи по сравнению с прессованными сохраняют свою ферментативную активность более продолжительное время, так как процессы жизнедеятельности клеток в обезвоженном продукте значительно затормаживаются, но не прекращаются совсем. При этом инактивируются бродильные ферменты, протекают процессы автолиза, в результате чего ухудшается подъемная сила дрожжей.

Для сохранности сушеных дрожжей большое значение имеет их упаковка. В настоящее время в дрожжевой промышленности в качестве упаковочных материалов используют жестяные банки, некоторые виды полимерных пленок, лакированный целлофан и другие упаковочные материалы, разрешенные Министерством здравоохранения РФ. В жестяные банки упаковывают сушеные дрожжи массой нетто 100–2000 г, в пакеты массой нетто 10–2000 г. Банки, коробки и пакеты с дрожжами упаковывают в плотные дощатые ящики, а пакеты массой нетто 0,01–0,05 кг – в плотные деревянные ящики, выстланные оберточной бумагой. Нефасованные сушеные дрожжи упаковывают в бумажные мешки массой нетто 10–25 кг или в плотные ящики, выстланные внутри пергаментом или под пергаментом массой нетто 10–20 кг. Для лучшей сохранности нефасованной продукции можно использовать полиэтиленовый мешок, который вкладывается внутрь бумажного мешка.

Вид упаковки следует выбирать в зависимости от качества сушеного продукта.

Дрожжи с подъемной силой до 60 мин, влажностью до 8%, содержанием трегалозы более 15% СВ упаковывают герметически в полимерную пленку, полиэтилен-целлофан и жестебанки. При этом дрожжи сохраняются более 12 мес. Дрожжи с подъемной силой 61–70 мин, влажностью 8,1–10% и содержанием трегалозы 11–14% СВ упаковывают герметически, как описано выше (при этом срок сохранности их составляет – 12 мес.), а также негерметически в бумагу-полиэтилен, крафт-мешки с полиэтиленовым вкладышем (срок хранения дрожжей при этом снижается до 4–6 мес.).

Дрожжи с подъемной силой 61–70 мин, влажностью до 8%, содержанием трегалозы 9–10% СВ упаковывают негерметически в бумагу-полиэтилен, крафт-мешки с полиэтиленовым вкладышем. Срок хранения дрожжей при этом составляет 4–5 мес. Дрожжи с подъемной силой 71–90 мин, влажностью 8,1–10% и содержанием трегалозы 6–8% СВ хранению не подлежат, так как не сохраняются в любой упаковке.

В последние годы в пищевой промышленности для упаковки пищевых продуктов все большее применение находят полимерные пленочные материалы, из которых для упаковки сушеных дрожжей наиболее эффективным оказался полиэтилен-целлофан (ПЦ-2). Он защищает продукт от доступа кислорода и влаги. В связи с тем, что сушеные дрожжи являются весьма гигроскопичными и быстро теряют свою активность при соприкосновении с кислородом воздуха и влагой, эта пленка позволяет сохранить качество сушеных дрожжей при их хранении.

Сушеные дрожжи хранят в холодильных камерах при температуре не выше 15°C. Складское помещение должно быть сухим, чистым и вентилируемым. Не допускается совместное хранение сушеных дрожжей с ядовитыми веществами и остро пахнущими продуктами.

Производство сушеных дрожжей – комплексный технологический процесс, включающий использование специальных рас, режимов получения маточных и товарных дрожжей, высушивание, упаковку и хранение дрожжей. Все это звенья одного и того же процесса, тесно связанные между собой. Недочеты в одном из них могут повлечь за собой ухудшение качества сушеной продукции, несмотря на правильное ведение процесса в других звеньях.

Вопросы

1. Как происходит отделение дрожжей от бражки и промывание?
2. Какие способы прессования дрожжей существуют?
3. Чем отличаются требования к дрожжам предназначенным для сушки и для прессования?
4. Опишите принцип процесса сушки дрожжей.
7. Какие режимы сушки дрожжей Вы знаете?
8. Правила упаковки дрожжей.
9. Какие факторы влияют на хранение сушеной продукции?

Тема 9. Кормовые дрожжи

- 9.1. Характеристика кормовых дрожжей.
- 9.2. Технология производства кормовых дрожжей.
 - Выращивание посевных дрожжей.
 - Выращивание кормовых дрожжей.
 - Выделение дрожжевых клеток.
 - Обогащение кормовых дрожжей витамином D₂.
 - Термолиз дрожжей.
 - Упаривание дрожжевого концентрата и сушка в распылительных сушилках.

9.1. Характеристика кормовых дрожжей

Кормовые дрожжи – высокоценный белково-витаминный продукт. Микробный протеин, синтезируемый дрожжами, по усвояемости и содержанию аминокислот превосходит протеин животного происхождения, повышает биологическую ценность белков других кормов. Белок кормовых дрожжей переваривается в организме животных на 95%. Сера и ее соединения, входящие в состав, участвуют в биологических процессах образования аминокислот. Ферментные системы дрожжей катализируют процессы усвоения аминокислот и синтеза белка. Фосфор и кальций, находящийся в составе дрожжей, способствуют нормальному развитию костного скелета. Витамины группы В, входящие в состав дрожжей, являются регуляторами метаболизма жиров. Противопоказаний к применению кормовых дрожжей не имеется. Передозировка кормовых дрожжей не вызывает побочных явлений. Применение продукта не влияет на сроки убоя животных и использование молока. Вид кормовых дрожжей определяется штаммом гриба-продуцента и средой его выращивания. В качестве штаммов-продуцентов кормового белка используют микроскопические грибы родов *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Torulopsis* и др., они представляют собой одноклеточные микроорганизмы (грибы), способные развиваться в питательной среде, которая содержит источники углеводного и минерального (N, P, K, Mg, Ca, Fe, Mn, Zn

и т.д.) питания, а также растворенный кислород. В процессе роста биомассы в дрожжевой клетке происходит ферментативный синтез белка.

Сырьем для питательных сред могут служить: углеводороды нефти (очищенные жидкие парафины), низшие спирты (этанол и метанол), гидролизаты древесных отходов (опилки, стружка, щепа), гидролизаты с/х отходов (солома, шелуха семян, кукурузная кочерыжка и т.п.), сульфитные щелока целлюлозно-бумажного производства, послеспиртовые барды гидролизно- и сульфитно-спиртовых производств. В зависимости от среды, в которой выращивали дрожжевую клетку различают гидролизные, кормовые классические и белково-витаминный кормовой дрожжевой белок. Готовые кормовые продукты из разного сырья несколько различаются по цвету и структуре.

Таблица 8 – Технологические характеристики кормовых дрожжей разных групп

Тип кормовых дрожжей	Среда для культивирования дрожжевых клеток	Готовый кормовой продукт		Выход кормового белка на 1 т сухого сырья, кг
		структура	цвет	
Гидролизные	Древесные и с/х отходы	Порошок, гранулы	Желтый, темно-желтый	240-450
Кормовые классические	Послеспиртовая барда	Чешуйчатый порошок, гранулы	Светло-коричневый, коричневый	260-400
БВК	Парафины нефти, низшие спирты, природный газ	Порошок, гранулы	Светло-желтый, светло-коричневый	600-800

В силу некоторых особенностей технологии, разных биохимических свойств продуцента, различного выхода готового продукта на единицу исходного сырья потребителю, готовый кормовой продукт из разного сырья различается по химическому составу.

Сравнение химического состава рассматриваемых групп дрожжей (табл. 9) свидетельствует о некоторых различиях в питательности и биологических свойствах этих протеиновых добавок.

Таблица 9 – Химический состав кормовых дрожжей разных групп

Показатель	Кормовой дрожжевой белок		
	на спиртовой барде	на древесных опилках	на парафинах нефти, спиртах и газе
Сырой протеин, %	38–51	40-56	42-60,5
Белок по Барнштейну, % от сырого протеина	30–42,80–90	22–38,65–89	27–37,75–85
Концентрация, %, пуриновых оснований, пиримидиновых оснований	2-6, 0-3	8-13, 2-4	8-10, 0-5
Вероятность накопления избытка РНК	Незначительная	Значительная	Значительная
Вероятность накопления живых клеток продуцента	Незначительная	Значительная	Значительная
Обменная энергия, Ккал/100 г	220	216	239
Сырая клетчатка, %	1,2-2,9	1,3–2,7	1,5–1,9
Сырая зола, %	3,9–7,1	4,4–7,7	5,9–7,8
Сырой жир, %	2,2–3,1	2,7–3,3	7,2–7,6
Моно и дисахариды, г/кг	3,9–8,8	3,2–5,1	8–8,5
Органические кислоты, г/кг	23	18	21
Ненасыщенные жирные кислоты, мг/кг	540	590	500
Холестерин, мг/кг	-	-	260
Пищевые волокна, г/кг	1,8	2,9	2,1

Первая отличительная черта дрожжей разных групп колебания концентрации протеина, белка по Барнштейну и небелкового азота. Максимумом протеина отличаются дрожжи БВК. В них также наиболее низкая концентрация небелкового азота, а это залог безопасного использования в кормлении животных. Небелковый азот вызывает расстройства пищеварения у молодняка, снижение приростов, резкое ухудшение качества получаемой продукции.

Классические кормовые дрожжи имеют более низкую концентрацию пуриновых и пиримидиновых остатков нуклеиновых кислот. Это свойство – залог кормовой безопасности этих дрожжей. Поэтому кормовой дрожжевой белок предпочтительнее использовать в рационе птицы. Известно, что накопление в дрожжах нуклеопротеидов становится причиной увеличения концентрации этих азотистых оснований в крови и межклеточном веществе организма птицы. Конечный продукт обмена пуринов и пиримидинов – мочевая кислота. Нарушения баланса ее синтеза и удаления из организма приводят к подкислению крови, появлению мочевых камней в почках, отложению мочекислых солей в суставах. Возникает болезненность, мацерация, развивается клоацит, каннибализм, снижается продуктивность. Птица, получавшая рационы с включением рекомендованных норм дрожжей, содержащих избыток пуринов и пиримидинов, быстро стареет. В кормовых классических дрожжах концентрация пуринов и пиримидинов в 2–3,5 раза ниже, чем в гидролизных и БВК. Однако сложность определения концентрации нуклеопротеидов в лабораториях комбикормовых заводов и птицефабрик не позволяет потребителю ее контролировать. В практике приготовления кормовых добавок не известно ни одного случая, когда в дрожжах полностью отсутствовали бы пуриновые и пиримидиновые основания, а также рибонуклеиновая кислота (РНК). Поэтому речь идет только о концентрации этих веществ на единицу массы готовой кормовой добавки и норме ввода в рацион птицы. Наличие нуклеотидных остатков в дрожжах ограничивает эту норму цыплятам всех видов птицы до 3–5% от массы корма.

Зола кормового дрожжевого белка содержит ценные для животных и птиц макро- и микроэлементы: фосфор, калий, кальций, железо, магний, натрий, серу, медь, кобальт и др. Ниже приведен химический состав кормовых дрожжей, выращенных на различном сырье.

В настоящее время в России кормовой дрожжевой белок на парафинах нефти не производится, кормовые дрожжи, выращенные на других видах сырья существенно не различаются по химическому составу, между ними существует небольшое колебание в содержании истинного белка, что сказывается только на стоимости данного продукта, но не оказывает влияния на питательность белкового корма и эффективность вскармливания животных.

Нормы расхода кормового дрожжевого белка. Кормовой дрожжевой белок добавляют в рацион питания животных как белково-витаминную добавку, скармливать его животным и птицам в натуральном виде не рекомендуется. По общей питательности 1 кг кормовых дрожжей содержит 1,03–1,16 кормовых единиц и особенно много перевариваемого (истинного) белка: 380–480 г. Особую ценность кормовые дрожжи представляют для племенных свиноматок: улучшается их общее состояние, повышается молочность, снижается смертность поросят.

Сухие кормовые дрожжи в основном используются в комбикормовой промышленности. В рецептуре комбикормов для различных видов сельскохозяйственных животных кормовые дрожжи составляют 3–5%, а в белковых концентратах для свиней – 15–20%.

Средняя норма использования дрожжей составляет 1 г сухих дрожжей в сутки на 1 кг живой массы животного.

Рекомендуемые нормы добавки кормовых дрожжей животного на голову в сутки:

- КРС (быки, коровы)..... 500 г/сут.
- молодняк КРС 300 г/сут.
- телята 200 г/сут.
- свиноматки 2 50 г/сут.
- подсвинкам племенным 200 г/сут.
- подсвинкам на откорме 150 г/сут.
- лошадям 500 г/сут.
- жеребятam 300 г/сут.
- птице взрослой 5 г/сут.
- цыплятам 2 г/сут.

Сырьем для питательных сред, на которых культивируются дрожжи, могут служить: углеводороды нефти (очищенные жидкие парафины), низшие спирты (этанол и метанол), гидролизаты древесных отходов (опилки, стружка, щепа), гидролизаты сельскохозяйственных отходов (солома, шелуха семян, кукурузная кочерыжка и так далее), сульфитные щелока целлюлозно-бумажного производства, послеспиртовые барды гидролизно- и сульфитно-спиртовых производств.

В зависимости от среды, в которой выращивали дрожжевую клетку различают гидролизные, кормовые классические и белково-витаминный кормовой дрожжевой белок.

Готовые кормовые продукты из разного сырья несколько различаются по цвету и структуре.

В силу некоторых особенностей технологии, разных биохимических свойств продуцента, различного выхода готового продукта на единицу исходного сырья, готовый кормовой продукт из разного сырья различается по химическому составу.

Первая отличительная черта дрожжей разных групп – колебания концентрации протеина, белка по Барнштейну и небелкового азота. Максимумом протеина отличаются дрожжи БВК. В них также наиболее низкая концентрация небелкового азота, а это залог безопасного использования в кормлении животных. Небелковый азот вызывает расстройства пищеварения у молодняка, снижение приростов, резкое ухудшение качества получаемой продукции.

Классические кормовые дрожжи имеют более низкую концентрацию пуриновых и пиримидиновых остатков нуклеиновых кислот. Это свойство – залог кормовой безопасности этих дрожжей. Поэтому кормовой дрожжевой белок предпочтительнее использовать в рационе птицы. Известно, что накопление в дрожжах нуклеопротеидов становится причиной увеличения концентрации этих азотистых оснований в крови и межклеточном веществе организма птицы. Конечный продукт обмена пуринов и пиримидинов – мочевая кислота. Нарушения баланса ее синтеза и удаления из организма приводят к подкислению крови, появлению мочевых камней в почках, отложению мочекислых солей в суставах. Возникает болезненность, мацерация, развивается клоацит, снижается продуктивность. Птица, получавшая рационы с включением рекомендованных норм дрожжей, содержащих избыток пуринов и пиримидинов, быстро стареет.

В кормовых классических дрожжах концентрация пуринов и пиримидинов в 2–3,5 раза ниже, чем в гидролизных и белково-витаминных концентратах. Однако сложность определения концентрации нуклеопротеидов в лабораториях комбикормовых заводов и птицефабрик не позволяет потребителю ее контролировать. В практике приготовления кормовых добавок не известно ни одного случая, когда в дрожжах полностью отсутствовали бы пуриновые и пиримидиновые основания, а также рибонуклеиновая кислота (РНК). Поэтому речь идет только о концентрации этих веществ на единицу массы готовой кормовой добавки и норме ввода в рацион птицы. Наличие нуклеотидных остатков в дрожжах ограничивает эту норму цыплятам всех видов птицы до 3–5% от массы корма.

9.2. Технология производства кормовых дрожжей

Выращивание посевных дрожжей. Для производства кормового белка в настоящее время используют дрожжи в основном семейства *Gryptococcaceae*, рода *Candida*. Они способны расти на разнообразных субстратах и давать высокий выход биомассы. В отличие от бактерий и грибов, выращивание которых проводится в стерильных условиях, производство кормовых дрожжей – процесс нестерильный. На большинстве заводов внедрены промышленные штаммы дрожжей – *Candida tropicalis* (Гб-1 и КД-14), обеспечивающие выход биомассы 46–48% от содержания РВ, *Candida scottlii* (Кр-9, Тул-1, СД-10), дающие выход биомассы 55–56% от содержания РВ. В результате селекционно-генетических исследований были получены быстрорастущие дрожжи *Candida guilliermondii*, устойчивые к вытеснению другими видами в нестерильных промышленных условиях и позволяющие получать выход биомассы 90–120% от потребляемых н-алканов.

Практикой дрожжевого производства установлено, что при выращивании одной и той же культуры дрожжей получают различные результаты, даже если питательные среды по составу сравнительно мало различаются между собой. В производственных условиях под влиянием различных факторов образуются новые штаммы, которые наиболее полно адаптируются к существующим условиям.

Для получения посевного материала питательную среду засевают чистой культурой из расчета, чтобы биомасса засевных дрожжей влажностью 75% не превышала 20–30% суммы углеродсодержащих соединений среды. Нарращивание биомассы чистой культуры дрожжей, необходимой для засева дрожжерастильного аппарата, осуществляется в несколько стадий. На первой стадии чистую культуру дрожжей размножают в лаборатории завода в несколько приемов в колбах, а затем последовательно в трех или четырех аппаратах всевозрастающего объема. Каждый аппарат снабжен системой воздухораспределения, змеевиком для охлаждения питательной среды и барботером для пропарки аппарата. Первый аппарат установки для получения засевных дрожжей засеивается культурой, выращенной в лабораторных условиях, все последующие аппараты – дрожжами, получаемыми на предыдущих стадиях. Как правило, выращивание дрожжей на первых стадиях периодическое, а на последней – непрерывное.

Число стадий и объемы используемых дрожжерастильных аппаратов определяется производительностью предприятия, перерабатываемым сырьем и принятой схемой производства. Так, для линии производства кормовых дрожжей на основе высокоочищенных жидких парафинов производительностью 60 тыс. т в год предусмотрено выращивание чистой культуры в три стадии в аппаратах вместимостью (в м³): 0,3; 3 и 50. Аппараты I и II стадий работают по периодическому режиму, а аппарат III стадии может работать как по периодическому, так и по непрерывному режиму. Концентрация перерабатываемых парафинов 7%. На всех стадиях температуру питательной среды поддерживают на уровне 33–35 °С, рН устанавливают раствором аммиака в пределах 4,0–4,2. Конечная концентрация биомассы на всех стадиях составляет 43–54 г/л (АСД). Длительность выращивания посевных дрожжей как на I, так и на II стадии 16–18 ч, на III – 5 ч. Из аппарата III стадии засевные дрожжи перекачиваются в производственные дрожжерастильные аппараты.

Выращивание кормовых дрожжей. Получение биомассы является основным процессом в технологической схеме производства кормовых дрожжей. Для получения высоких выходов требуются непрерывный равномерный приток питательной среды и отбор дрожжевой бражки, интенсивная аэрация, строгое соблюдение температурного режима и поддержание оптимального рН среды. Постоянный приток питательной среды и отбор бражки из дрожжерастильного аппарата должны обеспечивать постоянный объем среды в аппарате. В зависимости от качества перерабатываемого сырья скорость подачи питательной среды может быть различной.

Все питательные вещества, в том числе и кислород, используются микроорганизмами в растворенном состоянии. Для удовлетворения потребности микроорганизмов в кислороде необходимо создать определенную концентрацию его в среде. Кислород относится к труднорастворимым газам и при прохождении через жидкость только некоторая часть его переходит в раствор, а остальное количество не используется. Потребность растущей культуры в кислороде в основном определяется составом среды. Чем богаче среда питательными веществами, тем больше воздуха необходимо подавать в аппарат и возможно лучше его диспергировать.

В дрожжерастильных аппаратах для диспергирования воздуха применяются различные воздухораспределительные и перемешива-

ющие устройства. Расход воздуха колеблется от 20 до 50 м³ на 1 кг абс. сухих дрожжей. Следует отметить, что переработку субстрата с высокими (3–5 %) концентрациями РВ или парафинов лимитирует содержание растворенного кислорода в среде. При использовании существующих конструкций дрожжерастильных аппаратов наблюдается неполная ассимиляция микроорганизмами углеводов нефти. В ряде случаев оказывается возможным повысить степень утилизации углеводов в результате выращивания дрожжей при относительно низких концентрациях парафинов в среде с возвратом культуральной жидкости (после отделения дрожжей) до полного использования всех парафинов.

Нормальный рост и развитие дрожжевых клеток в значительной мере зависят от сбалансированности источников азота, фосфора, серы, калия, железа и др., т. е. от минерального питания. Известно, что недостаток или избыток некоторых ингредиентов среды приводит к снижению жизнедеятельности дрожжей.

В зависимости от используемой культуры в производстве дрожжей выращивание проводят при температуре 32–36 °С. С понижением температуры замедляется жизнедеятельность дрожжей, а при повышении температуры выше 38–40 °С резко уменьшается активность поглощения кислорода, снижаются выход дрожжей и содержание белка в клетках. При выращивании дрожжей выделяется от 2500 до 3500 кал тепла на 1 кг сухих дрожжей. До 40 % тепла, образующегося в процессе роста дрожжей, уносится продуваемым воздухом, а остальное количество отводится с помощью охлаждающих устройств. С этой целью, в дрожжерастильный аппарат встраиваются различные теплообменники, а также используется метод орошения наружных стенок аппарата. Для снятия части избыточного тепла питательную среду, подаваемую в аппарат, необходимо охлаждать ниже оптимальной температуры на 10–12 °С.

Важным фактором при выращивании дрожжей является оптимальное значение рН среды. Различные штаммы дрожжей нормально развиваются в слабокислой среде при рН 3,5–5,5. В зависимости от состава питательной среды рН в процессе роста культуры может сдвигаться как в щелочную, так и в кислую сторону, тем самым нарушая оптимальные условия выращивания дрожжей. Для поддержания рН на оптимальном уровне в процессе роста дрожжей среду подкисляют соляной кислотой, либо подщелачивают аммиачной водой.

Эффективность процесса культивирования определяется выходом биомассы с единицы полезной емкости дрожжерастильного аппарата. Выход биомассы – так называемый экономический коэффициент – представляет собой отношение количества синтезированной абсолютно сухой биомассы к потребленным питательным веществам среды. Экономический коэффициент может быть определен по формуле:

$$Y = x / (S_0 - S_1),$$

где: x – концентрация дрожжей в среде, г/л; S_0 – концентрация питательных веществ в исходной среде; S_1 – концентрация питательных веществ на выходе из аппарата.

Дрожжи рода *Candida* относятся к небродящим дрожжам. В связи с этим основное количество источников углерода среды расходуется на образование биомассы, что и обеспечивает высокий экономический коэффициент – до 50%, а при использовании очищенных жидких парафинов – 90–120%.

Максимальный выход дрожжей возможен лишь в том случае, если средняя длительность t пребывания среды и дрожжевых клеток в аппарате равна генерационному периоду g , т.е. когда справедливо равенство $t = g = 1/u$. Если $t < g$, концентрация клеток в среде уменьшается. Если $t > g$, выход биомассы снижается, так как увеличивается время пребывания среды в аппарате. При непрерывном культивировании производительность Q аппарата определяется как произведение скорости разбавления D на концентрацию биомассы x в среде. Но поскольку $x = (S_0 - S) Y$ или $x = S_1 Y$, то $Q = DS_1 Y$ [кг/(м³·ч)].

Для получения оптимального выхода дрожжей и обеспечения необходимой производительности аппарата необходимо подобрать такие условия процесса выращивания, при которых скорость протока соответствовала бы скорости роста дрожжей и ассимиляции ими питательных веществ среды. Иными словами, важно правильно определить длительность t пребывания в аппарате среды и дрожжевых клеток. T (оборот аппарата) является величиной, обратной D , следовательно, и u . $T = 1/u = 1/D$. Если дрожжевые клетки равномерно распределены и концентрация их в аппарате и на выходе одинакова, то продолжительность пребывания дрожжей в аппарате равна пребыванию в нем среды.

Непрерывное культивирование кормовых дрожжей может осуществляться по различным технологическим схемам. При выращива-

нии дрожжей в одночленной батарее в аппарат непрерывно подаются основное углеродсодержащее сырье, питательные соли и отводится дрожжевая суспензия. Отбор дрожжей полностью компенсируется их приростом. Это достигается при условии, что удельная скорость роста дрожжей и равна скорости разбавления среды. Максимальная утилизация питательных веществ среды происходит в одном аппарате (рис. 5).

При переработке очищенных жидких парафинов облегченной фракции в технологическую схему включается процесс «дозревания» биомассы. Он предусматривает выдержку биомассы дрожжей в аппарате, в который поступление питательных веществ прекращено. Жизнедеятельность клеток осуществляется за счет эндогенных источников питания, при этом используются остаточные углеводороды. После стадии «дозревания» упрощается выделение дрожжей и исключается необходимость их экстрактивной очистки. Это обеспечивает высокое качество продукта и более полное использование парафинов.

Двухступенчатое культивирование (двухчленная батарея) применяют при переработке концентрированных сред и сред сложного состава (рис. 6). При последовательном перетекании среды из аппарата в аппарат в головном обычно утилизируется 70–80% углеродсодержащих веществ, остальные – в хвостовом. Производительность многоступенчатой дрожжерастильной установки меньше, чем одноступенчатой (в расчете на один аппарат), но выход дрожжей больше из единицы перерабатываемого сырья.

Практика показала, что каждая из схем имеет свои преимущества и недостатки и может быть реализована с использованием дрожжерастильных аппаратов различных конструкций. Как правило, выращивание кормовых дрожжей на действующих предприятиях, перерабатывающих гидролизные среды и меласно-спиртовую барду, осуществляется в эрлифтных аппаратах конструкции Лефрансуа-Марийе и гипробиосинтеза вместимостью 300 и 600 м³. На гидролизно-дрожжевых заводах большой мощности работают аппараты вместимостью 1300 м³ с многозонным воздухораспределением. Заводы, работающие на жидких парафинах, оснащены аппаратами Б-50, позволяющими совместить стадии выращивания и дозревания биомассы в одном аппарате (рис. 7).

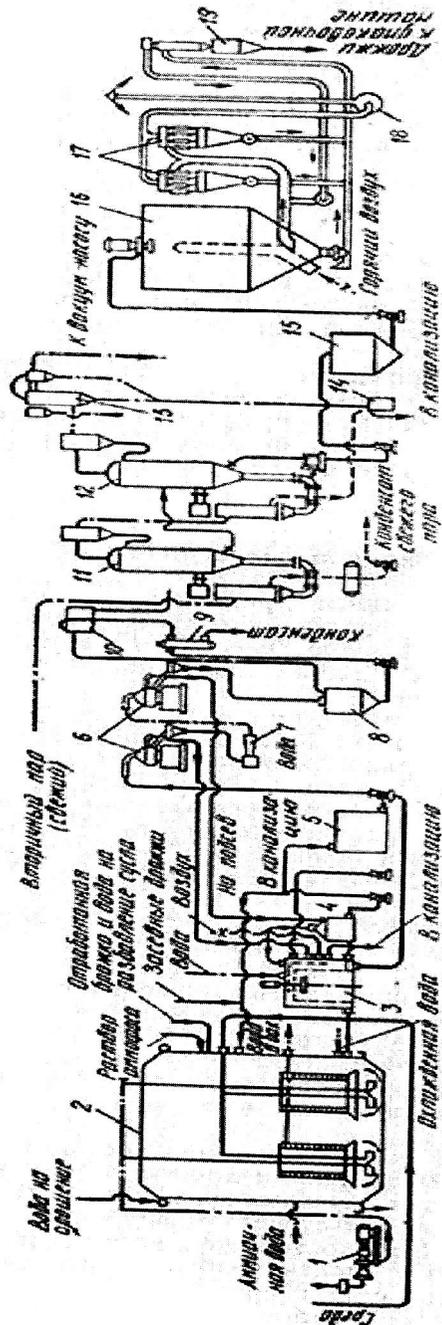


Рис. 5. Схема выращивания и выделения дрожжей:

1 – воздухоподувки; 2 – дрожжерастительный аппарат; 3 – флогатор; 4 – газоотделитель; 5 – сборник; 6 – сепараторы; 7 – водоструйный насос; 8 – сборник дрожжевого концентрата; 9 – подогреватель-плазмолизатор; 10 – напорный бак; 11, 12 – выпарные аппараты; 13 – барометрический конденсатор; 14 – барометрический ящик; 15 – сборник упаренного дрожжевого концентрата; 16 – распылительная сушилка; 17 – циклон; 18 – вентилятор; 19 – бункер для дрожжей

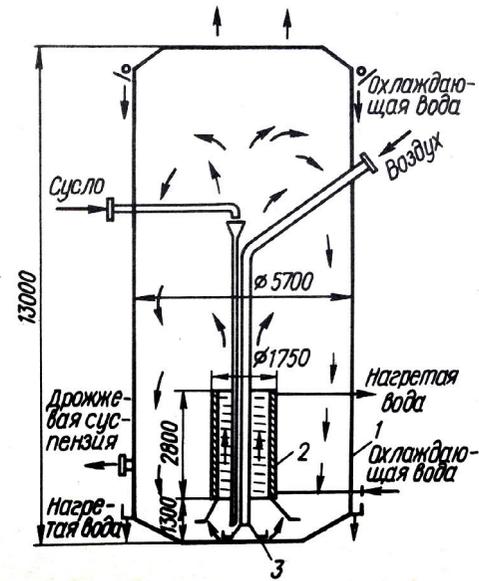


Рис. 6. Дрожжерастительный аппарат

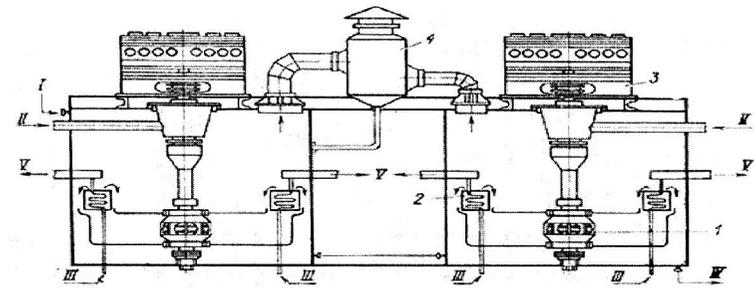


Рис. 7. Аппарат для выращивания дрожжей на углеводородах нефти: 1 – турбина; 2 – теплообменник; 3 – электродвигатель; 4 – скруббер; I – питательная среда; II – воздух; III – вода на охлаждение; IV – дрожжевая суспензия; V – вода из теплообменника

Аппарат представляет собой тор, выполненный из нержавеющей стали, диаметром 17 м, разделенный вертикальными перегородками на 12 секций. Внутренний диаметр тора равен 6 м. На верхней крышке корпуса установлены пеногасители и двигатели аэрационных тур-

бин, смонтированных в каждой секции. Аэрационная турбина является вращающимся эжектором и служит для подачи воздуха в культуральную среду и для ее перемешивания. Вращающийся эжектор представляет собой двухъярусную самовсасывающую мешалку турбинного типа, снабженную эжекционными устройствами. Воздух к вращающемуся эжектору подводится по трубе, соединенной с турбиной через вставку, обеспечивающую герметичность.

Для создания необходимой циркуляции культуральной жидкости в секциях установлены диффузоры, перегородки и конические вставки. На диффузорах установлены змеевики теплообменных устройств, предназначенных для снятия избытка тепла при выращивании дрожжей. Система охлаждения ферментатора состоит из 24 спаренных теплообменников наружного контура и 12 – внутреннего контура.

Выделение дрожжевых клеток. В готовой бражке, поступающей на выделение дрожжей, обычно содержится от 20 до 40 г/л дрожжей влажностью до 75%. Для обезвоживания дрожжевой массы используются различные методы: флотация, сепарация, выпаривание и сушка. Последовательность операций удаления излишней влаги на действующих предприятиях различна:

- флотация, сепарирование, выпаривание, сушка;
- флотация, сепарирование, сушка, сепарирование, выпаривание, сушка.

В процессе обезвоживания дрожжевые клетки часто подвергают обработке, не связанной с удалением влаги, а способствующей повышению качества сухих кормовых дрожжей: промывка дрожжей на стадии сепарирования с целью отмывки от остатка среды; облучение дрожжевой суспензии ультрафиолетовыми лучами для превращения, содержащегося в дрожжах эргостерина в витамин D₂ и т.п.

Флотация. Особого внимания заслуживает флотационный способ выделения и сгущения дрожжевых клеток. Однако не все культуры микроорганизмов имеют достаточную флотирующую способность, которая в значительной степени зависит от физиологического состояния дрожжевых клеток. Для получения хорошего эффекта от флотационного выделения необходима большая поверхность контакта фаз (дрожжевые клетки – воздух), для чего требуется очень мелкое диспергирование воздуха. Флотационный способ выделения дрожжей имеет ряд преимуществ перед сепарационным. Значительно сокращаются число сепараторов, сумма капиталовложений, что является

экономически выгодным для предприятий большой (240 тыс. т/год) мощности. На флотационную способность дрожжей влияют раса дрожжей, размер клеток, наличие конгломератов. Одиночные клетки флотируются хуже, чем ветвистые дрожжи.

Флотационные аппараты, применяемые в микробиологической промышленности, выполняются в нескольких вариантах: горизонтальные конические, вертикальные цилиндрические, одноступенчатые с внутренним стаканом и двухступенчатые. Наиболее простой конструкцией является типовой одноступенчатый флотатор системы Гипрогидролиза (рис. 8). Аппарат состоит из наружного корпуса 1 с плоским днищем и внутреннего стакана 2, являющегося пеносборником. Кольцевое пространство между корпусом аппарата и пеносборником делится на ряд секций (I–V) с помощью перегородок. В секциях II–V установлены аэраторы 4. Пена гасится механическим способом. Отработанная культуральная жидкость выводится через встроенный карман, служащий гидрозатвором.

Исходная дрожжевая суспензия из дрожжерастильного аппарата через патрубок 6 поступает в I секцию флотатора, где извлекается до 80% дрожжей. Далее она проходит через нижнюю часть перегородок, не доходящих до дна II–V секций. В этих секциях извлекается соответственно 10,5 и 2% дрожжей. Образовавшаяся при этом пена также поступает во внутренний пеносборник. Концентрат из пеносборника центробежным насосом подается на сепарацию.

В секции I флотация осуществляется за счет газосодержания дрожжевой суспензии, выходящей из дрожжерастильного аппарата, в последующих секциях – путем барботажа. Потери дрожжей с отработанной бражкой составляют 3%. Производительность флотатора по исходной суспензии 40–70 м³/ч; время исчерпывания – 10 мин. Коэффициент флотации равен 5–6.

Одноступенчатая флотация имеет существенный недостаток – не позволяет получать концентрированные дрожжи с минимальными потерями. Более эффективной является двухступенчатая флотация кормовых дрожжей (рис. 9).

Согласно схеме, приведенной на рис. 9а, дрожжевая суспензия на I ступени флотации концентрируется от 35 (исходная) до 90–120 г/л (23–30 г/л абс. АСВ), остаточная концентрация дрожжей в культуральной жидкости 2–3 г/л. Обедненная дрожжевыми клетками культуральная жидкость подвергается флотации на II ступени, концентрат с содержанием 8–10 г/л дрожжей направляется на I ступень.

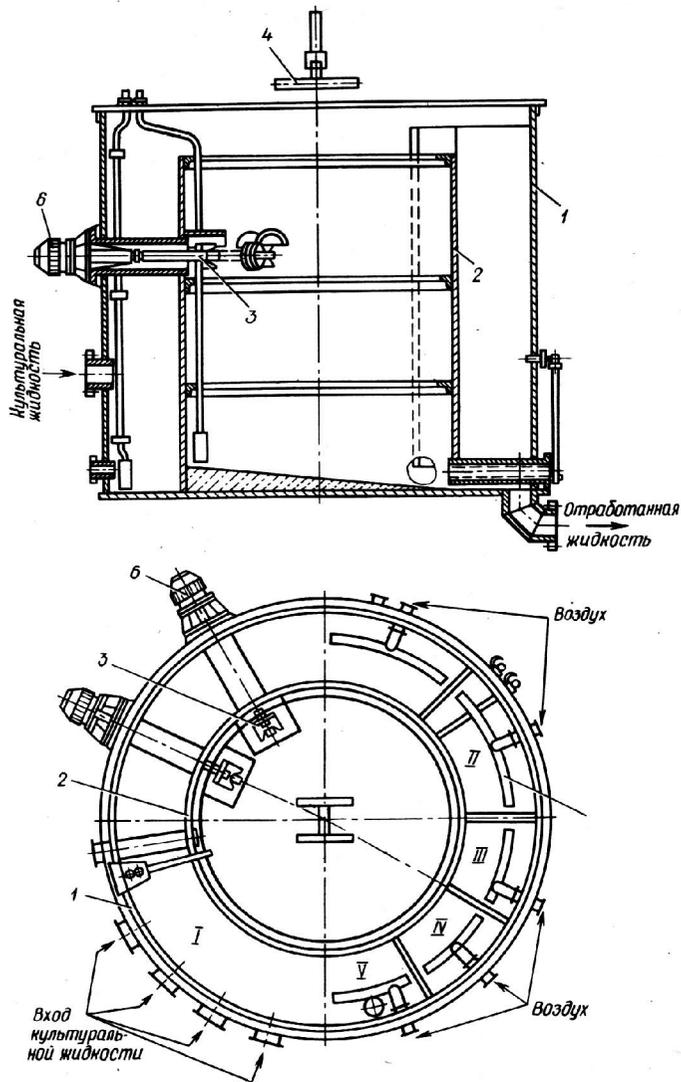


Рис. 8. Одноступенчатый флотатор конструкции Гипрогидролиза:
 1 – корпус; 2 – внутренний стакан; 3 – механические пеногасители;
 4 – ороситель; 5 – барботеры; 6 – электродвигатель мощностью
 4,5 кВт с частотой вращения 1450 мин^{-1}

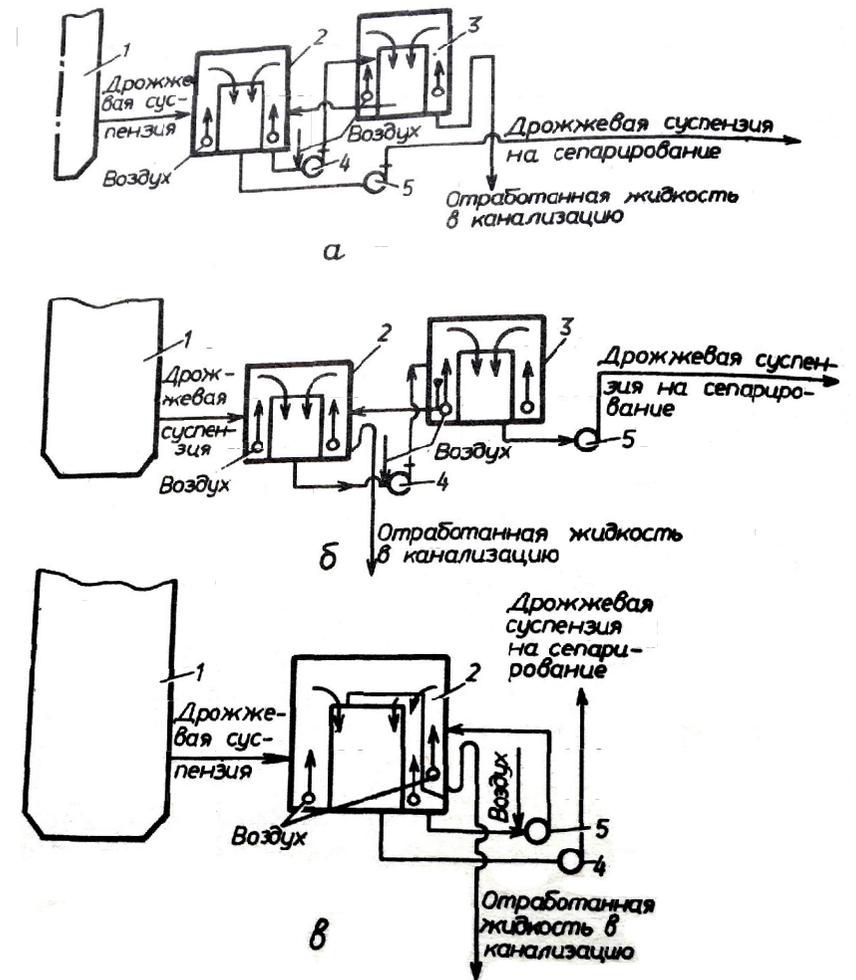


Рис. 9. Схемы узлов флотации дрожжей:
 1 – дрожжерастительный аппарат; 2 – флотатор 1 ступени;
 3 – флотатор 2 ступени; 4, 5 – насосы

Остаточное содержание дрожжей в отработанной культуральной жидкости после II ступени не превышает 0,2–0,3 г/ц.

По схеме на рис. 9б на I ступени флотации концентрация дрожжей повышается с 30 до 60 г/л (до 15 г/л абс. АСВ). На II ступени флотации происходит дальнейшее повышение концентрации с 60 до 120 г/л, а отработанная культуральная жидкость с содержанием 3–4 г/л дрожжей возвращается на I ступень флотации.

Схема, приведенная на рис. 9в, не отличается от схемы, показанной на рис. 9а, только II ступень флотации конструктивно вписана в корпус флотатора в виде кармана, не достигающего до дна.

Сепарация. Перед сепарированием для снижения потерь дрожжевую бражку (концентрат) обесценивают. Механическое пеногашение является наиболее эффективным средством оживления пены. Для этих целей используют лопастные или другие виды мешалок. При необходимости промывать дрожжевую суспензию в верху деэмульгатора монтируют распылительное устройство типа оросителя. При сепарировании происходит быстрое выделение дрожжей. Продолжительность пребывания дрожжевой бражки в барабане сепаратора 2–5 с. При нормальной работе сепараторов объем дрожжевого концентрата обычно составляет 10–25% объема бражки. Чем больше концентрация и вязкость бражки, тем меньше фактор разделения. Большие потери наблюдаются при сепарировании сильно пенящейся бражки. Метод сепарирования применяют для выделения нефлотируемых дрожжей и для дальнейшего сгущения концентрата после флотатора.

Обычно сепарирование дрожжей проводится на двух–трех группах сепараторов.

Получение доброкачественного продукта обеспечивает трехкратное сепарирование с двумя промывками дрожжевой массы водой. На I группе сепараторов получают концентрат с содержанием дрожжей 120–160 г/л. Концентрат, разбавленный водой (80–100 г/л), на II группе сепараторов концентрируется до 230–300 г/л; повторно разбавленный водой до 150–200 г/л на III группе сепараторов сгущается до 500–600 г/л. Промывка дрожжевой массы может быть осуществлена подачей воды в сборник дрожжевого концентрата или с помощью водоструйного насоса (рис. 10). На многих заводах используются различные схемы сепарирования дрожжей: двукратное сепарирование с частичной отмывкой дрожжей при расходе воды 5–7%; двукратное сепарирование без промывки после флотатора и др. (рис. 11). При нормальной работе сепараторов общие потери дрожжей при се-

парировании бражки и промывке суспензии не должны превышать 7%. Для выделения кормовых дрожжей методом сепарирования широко используют сепараторы ДСГ-35 (рис. 12) и сепараторы фирмы «Де Лаваль» (Швеция).

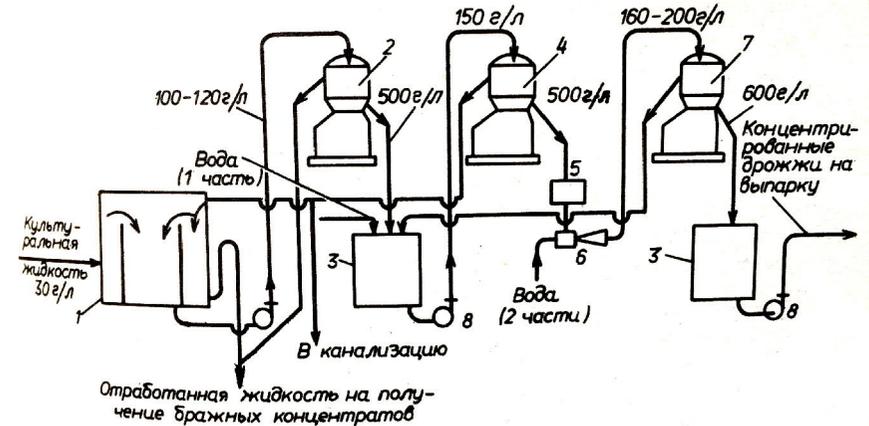


Рис. 10. Схема узла сепарирования дрожжей, полученных на гидролизном сусле

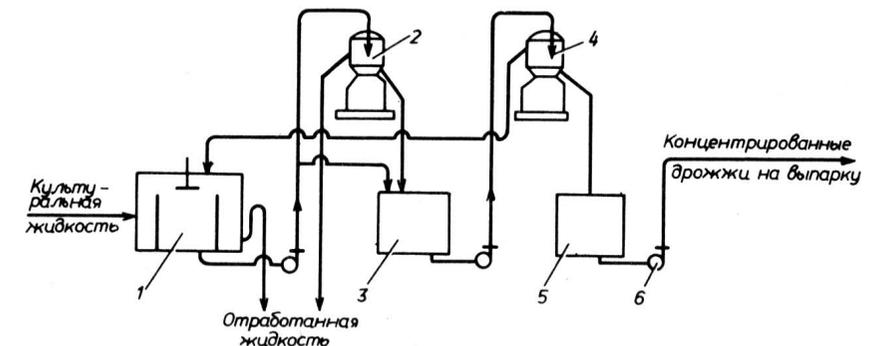


Рис. 11. Схема узла сепарирования без промывки дрожжей водой:
1 – флотатор; 2 – сепаратор 1 группы; 3 – сборник; 4 – сепаратор 2 группы; 5 – сборник концентрированных дрожжей; 6 – насосы

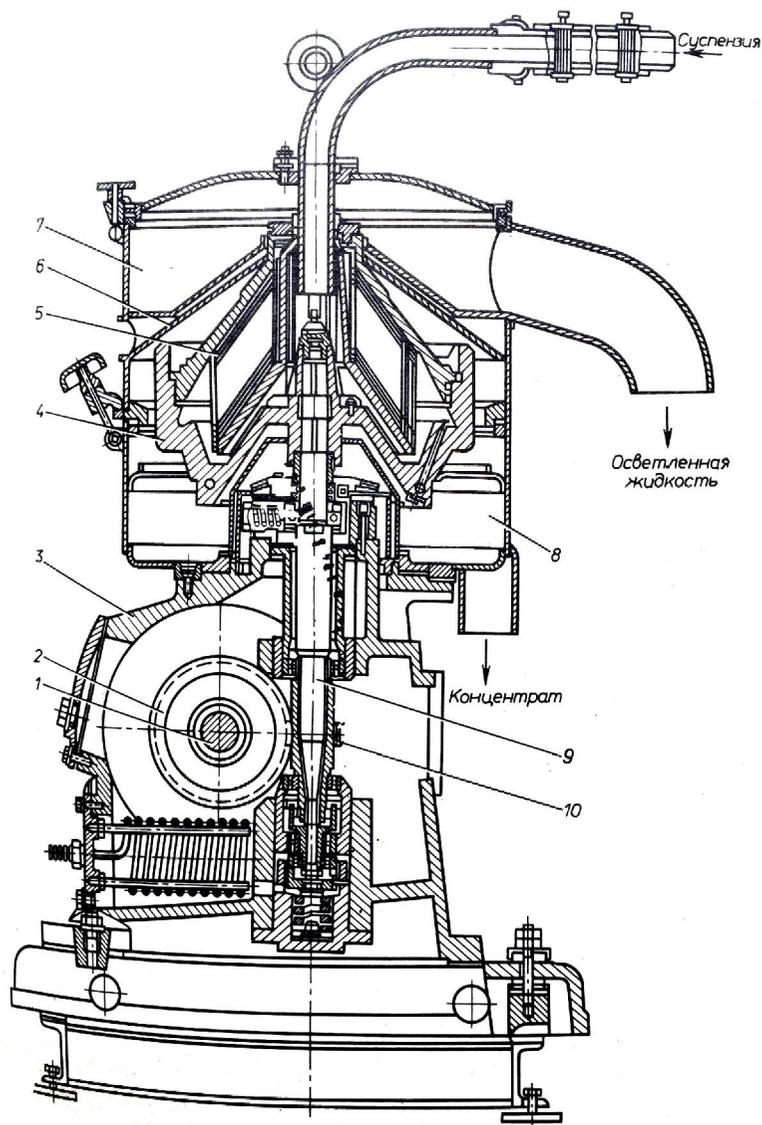


Рис.12. Дрожжевой сепаратор производительностью 35 м³/ч:

1 – приводной механизм; 2 – тахометр; 3 – сборник дрожжевого концентрата; 4 – барабан с комплектом конических тарелок; 5 – сборник для бражки; 6 – патрубок для входа сепарирующей жидкости

Обогащение кормовых дрожжей витамином D₂. Дрожжи рода *Candida*, выращенные на средах различного состава, содержат 0,2–0,6% эргостерина. Под влиянием ультрафиолетовых лучей он превращается в витамин D₂. В производственных условиях дрожжи облучают в сухом и в жидком виде. Сухие дрожжи облучают в тонком слое (1–1,5 мм) на движущейся ленте транспортера (рис. 13). Превращение эргостерина в витамин D₂ проходит через ряд изомерных продуктов и поэтому при неравномерном облучении могут образоваться вредные соединения. Суспензию дрожжей, прокачиваемую по кварцевым трубкам, облучают кварцевыми лампами. Дрожжевая суспензия должна быть достаточно хорошо отмыта от окрашенных продуктов среды. Кормовые дрожжи после облучения обычно содержат около 4000 международных единиц (м.е.) витамина D₂ 1 мг чистого витамина D₂ соответствует 40000 м.е. Содержание витамина D₂ в кормовых дрожжах можно довести до 8–10 тыс. м.е., но в этом нет необходимости, так как возникают трудности с дозированием. Для удовлетворения суточной потребности животного необходим всего 1 г сухих дрожжей, содержащих 5000–10000 м.е. витамина D₂.

Термолиз дрожжей. В процессе упаривания и сушки дрожжевой суспензии не все клетки теряют жизнеспособность. Живые дрожжи плохо усваиваются в организме животного и могут вызывать заболевание кандидомикоз. Следует отметить, что при выдерживании дрожжевой суспензии при температуре 20–25 °С происходит слабое брожение, вызываемое не только дрожжами, но и бактериями, при этом потери сухого вещества составляют около 5–15%. Поэтому дрожжевую суспензию, содержащую 400–500 г/л дрожжей, подвергают термолизу. Термолиз проводится в непрерывно действующем аппарате, где дрожжевая суспензия нагревается глущим паром до 75 °С и выдерживается при этой температуре не менее 45 мин. За это время погибают дрожжевые клетки и вся сопутствующая микрофлора. В процессе термолиза дрожжей, вследствие частичного гидролиза белков и перехода в раствор содержимого погибших клеток, увеличивается в 1,5–2 раза кислотность и содержание РВ.

Упаривание дрожжевого концентрата и сушка в распылительных сушилках. Для получения кормовых дрожжей 10%-ной влажности при сушке дрожжевого концентрата с содержанием 600 г/л (15% абс. СВ) надо выпарить около 5 т воды на 1 т воздушно-сухих дрожжей.

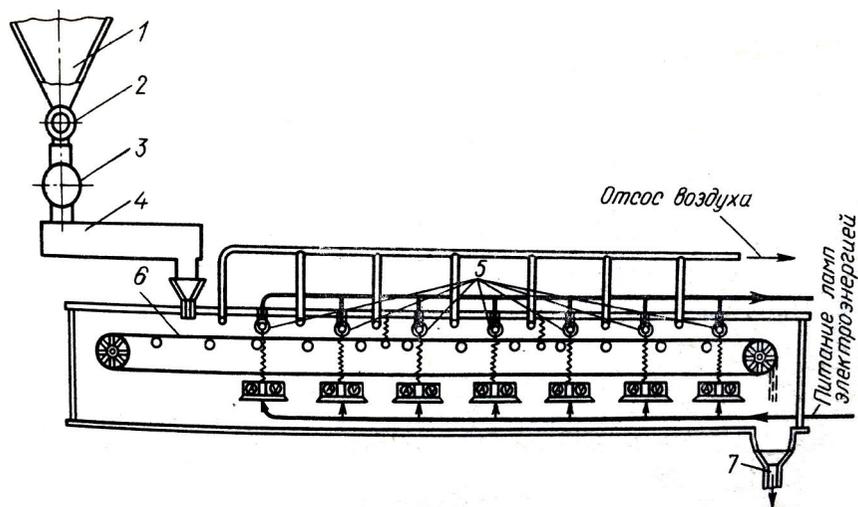


Рис. 13. Витаминизатор сухих дрожжей:

1 – бункер; 2 – дозатор; 3 – дисковая мельница; 4 – питатель;
5 – кварцевые лампы; 6 – ленточный конвейер; 7 – бункер для приема облученных дрожжей

С целью уменьшения затрат на сушку дрожжевого концентрата его подвергают сгущению в выпарном аппарате. Упаривание дрожжевого концентрата проводят до содержания в нем 23–25% СВ.

Упаривание проводится в одно- или двухкорпусной вакуум-выпарной установке при температуре не выше 80–85 °С. При упаривании дрожжевого концентрата желательно использовать выпарные аппараты с принудительной циркуляцией, чтобы избежать пригорания дрожжей к греющей поверхности. В результате пригорания образуется твердая пленка, которая трудно снимается не только химическими средствами, но и механически. После выпарной установки дрожжевой концентрат подвергается сушке в специальных сушильных установках, в которых происходит дальнейшее обезвоживание дрожжей до получения товарного продукта с влажностью 8–10%.

В настоящее время для сушки кормовых дрожжей применяют распылительные сушилки – аппараты непрерывного действия с подачей атмосферного воздуха. По способу подвода тепла к высушиваемому материалу распылительные сушилки относятся к конвективным конструкциям. В процессе сушки распылением в течение

одной рабочей операции происходит превращение какого-либо раствора или суспензии в порошок. На рис. 14 представлена схема распылительной сушилки с центробежным распылением и с нижним подводом сушильного агента.

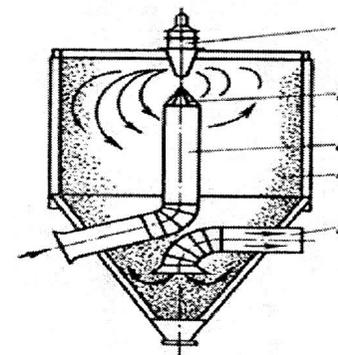


Рис. 14. Схема сушилки с центробежным распылением:

1 – центробежный распыляющий механизм; 2 – направляющий механизм; 3 – газопровод; 4 – сушильная камера; 5 – газоотвод

Дрожжевая суспензия непрерывно подается в распыленном состоянии в сушильную камеру, через которую проходит теплоноситель (сушильный агент) – нагретый воздух или дымовые газы, разбавленные воздухом до определенной температуры. Этот теплоноситель одновременно является и влагопоглощающим агентом. Распыленная дрожжевая суспензия, вступая в соприкосновение с сушильным агентом, отдает ему свою влагу, т. е. высушивается. С помощью распылительного механизма или форсунок дрожжевая суспензия распыливается в сушильной камере до мельчайших капель, средний размер которых не превышает 60–70 мкм. Теплоноситель подается в сушильную камеру по газопроводу, который заканчивается направляющим аппаратом. При помощи направляющего аппарата создается большая скорость движения теплоносителя на входе в сушильную камеру и одновременно теплоносителю сообщается спиралеобразное направление перемещения в сушилке. Практически принято считать, что при высокой степени распыления испарение жидкости протекает мгновенно.

Высушенные кормовые дрожжи в виде порошка опускаются в нижнюю конусную часть сушилки, откуда непрерывно удаляются.

При эксплуатации дрожжевых распылительных сушилок было установлено, что примерно 80–85 % высушенных дрожжей подаются на днище сушильной камеры, а остальные 15–20 % уносятся с отработанным сушильным агентом в пылеулавливающие аппараты. Отработавший в сушильной камере теплоноситель отводится из нее через газоотвод.

На большинстве заводов при сушке кормовых дрожжей начальная температура теплоносителя составляет около 300 °С, а на некоторых 350–400 °С. При этой температуре в верхней зоне сушильной камеры происходит интенсивное испарение влаги из дрожжевой суспензии, благодаря чему сушильный агент быстро охлаждается, температура его резко падает и на выходе из сушилки не превышает 85–90 °С. Высушенные дрожжи на выходе из сушилки также прогреваются не выше этой температуры.

Распылительные сушилки являются весьма сложными и небезопасными устройствами в эксплуатации.

Чаще всего в дрожжевом производстве применяют распылительные сушилки с центробежным распылением. Центробежное распыление осуществляется быстро вращающимся диском, к которому подводится дрожжевая суспензия. С увеличением скорости распыливающего диска и уменьшением вязкости подаваемой на сушку суспензии увеличивается степень дисперсности распыленной жидкости и, как следствие, повышается интенсивность работы сушильной камеры. На заводах при сушке кормовых дрожжей в распылительных сушилках в качестве топлива применяются природный газ и мазут, а на отдельных предприятиях – лигнин.

На рис. 15 представлена схема дрожжевой сушильной установки с центробежной распылительной сушилкой СРЦ-3200 с использованием в качестве топлива природного газа, разбавленного атмосферным воздухом до определенной температуры. Дрожжевая суспензия поступает сначала в бак, а затем в фильтры 7, предназначенные для очистки жидких дрожжей от посторонних механических примесей, чтобы предотвратить засорение отверстий и каналов в распылительном механизме. Очищенная дрожжевая суспензия подается насосом 4 по трубопроводу 31 через распылительный механизм 23 в сушильную камеру 25. С помощью центробежного диска суспензия распыляется до мельчайших частиц и высушивается в токе сушильного агента в камере 25. При отсутствии дрожжевой суспензии к распылительному механизму по трубопроводу 30 подводится вода.

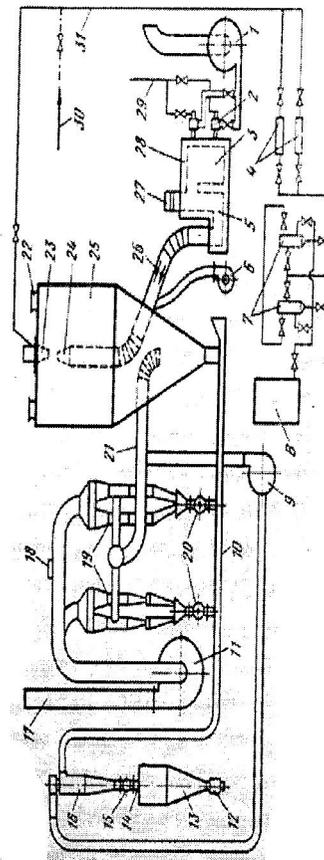


Рис. 15. Схема установки с центробежной распылительной сушилкой СРЦ-3200 с использованием в качестве топлива природного газа:

- 1 – топочный вентилятор; 2 – горелки; 3 – камера горения; 4 – насосы; 5 – камера смешения; 6 – вентилятор;
- 7 – фильтры; 8 – бак; 9 – вентилятор пневмотранспорта; 10 – трубопровод пневмотранспорта; 11 – дымосос;
- 12 – затвор; 13 – бункер на упаковке; 14, 18, 22, 27 – предохранительные клапаны; 15 – питатель; 16 – циклон; 17 – ход; 23 – центробежный распылительный механизм; 24 – направляющий аппарат; 25 – сушильная камера; 28 – толка; 29 – газопровод от ГРП; 30 – газопровод; 31 – трубопровод

Основное количество (80–85%) высушенных дрожжей сепарируется в конусной части сушильной камеры. Сепарация более мелких частиц сухих дрожжей из отработавшего сушильного агента после сушильной камеры осуществляется в сепарационной установке 19, которая состоит из двух групп циклонов по шесть в каждой группе. Сухие дрожжи из-под конуса сушилки и уловленные в циклонах подаются пневмотранспортом на упаковку. На некоторых заводах дрожжи на упаковку подаются механическим путем.

С помощью направляющего аппарата создается спиралеобразное направление движения сушильного агента в сушильной камере, при этом сушильный агент при выходе из направляющего аппарата приобретает значительные скорости (50–60 м/с).

При использовании в качестве сушильного агента продуктов сгорания природного газа повышается безопасность эксплуатации сушильной установки, так как содержание кислорода в сушильном агенте по сравнению с воздухом понижается.

Вопросы

1. Какие кормовые дрожжи используют в промышленности?
2. Что используют в качестве сырья для производства дрожжей?
3. Перечислите основные технологические этапы производства кормовых дрожжей.
4. Какие установки используют для выращивания посевных, кормовых дрожжей?
5. Назовите способы выделения дрожжевых клеток.
6. Как проводят обогащение кормовых дрожжей витамином D₂?
7. Что такое термолиз дрожжей?
8. Как проводится упаривание дрожжевого концентрата?

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Тема 1. Техника безопасности при работе в производственной лаборатории

Двойная цель техники лабораторной безопасности заключается в защите, как эксперимента, так и экспериментатора, но безопасность человека стоит, конечно, на первом месте.

Из того факта, что обычно используемые бактерии присутствуют в окружающей среде, как будто следует, что они безвредны для человека. Действительно, между непатогенностью и патогенностью нет резкой границы; фактически бактерии имеют широкий спектр степени вирулентности по отношению к человеку. Вчерашний сапрофит сегодня может стать паразитом, а завтра возбудителем заболевания (в качестве примеров можно назвать *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* и *Bacillus cereus*). Никогда нельзя забывать, что со всеми бактериями следует работать как с потенциальным источником опасности для здоровья человека.

Общие сведения. В зарубежной литературе последних лет опубликованы сведения о 3921 случае инфекций, полученных в лаборатории. Из этих данных следует, что работающие с бактериями подвержены риску заражения, но из них трудно сделать выводы о степени риска, поскольку отчеты о заражениях неполны, а число людей, подвергшихся риску, не указывается. Но возможность бактериального заражения в лабораторных условиях очевидна, и это требует соблюдения мер предосторожности при обращении с любыми бактериями независимо от того, «патогенны» они или нет.

Предотвращение заражения. Основной принцип безопасной работы и функционирования бактериологической лаборатории заключается в достаточной организации данной безопасности. При этом необходимо иметь полное представление о степени риска, существующем при работе с микроорганизмами, знать механизмы, благодаря которым могут возникать опасные ситуации, использовать приёмы и способы безопасной работы, которые позволяют уменьшить или ис-

включить возможность этих воздействий, и быть бдительными в отношении компромиссов и вероятных ошибок.

Мероприятия по предотвращению заражения людей и контаминации окружающего оборудования. При работе с бактериями необходимо тщательно выполнять следующие меры предосторожности:

1. Держать двери лаборатории закрытыми.
2. Дезинфицировать рабочие поверхности ежедневно и каждый раз после проливания растворов, содержащих бактерии.
3. Перед мытьем или повторным употреблением, оборудование, используемое в боксовой работе, должно быть автоклавировано или дезинфицировано.
4. Использовать устройства для набора жидкости в пипетки.
5. Не есть, не пить и не курить в лаборатории.
6. Часто мыть руки и всегда – перед выходом из лаборатории.
7. Все процедуры и манипуляции выполнять осторожно, сводя к минимуму образование аэрозолей.
8. На соответствующих лабораторных дверях установить знаки биологической опасности. Морозильники, холодильники и другие места хранения патогенных бактерий также должны быть снабжены этим знаком.
9. Надевать нателное лабораторное белье, защитную одежду или халаты. Не носить эту одежду вне лаборатории.
10. Избегать по возможности использования игл и шприцев.
11. На случай ликвидации последствий аварии, при работе с биологическим материалом, иметь аптечку экстренной профилактики.

После окончания боксовой работы помещение убирают и облучают бактерицидными лампами в течение 30–60 мин. Мощность облучения должна составлять 2,5 Вт на м². Помещение боксов моют не менее раза в неделю горячей водой с мылом, дезинфицирующими средствами.

Личная гигиена. Еду, конфеты, жевательную резинку и напитки нельзя хранить и употреблять в лабораторных комнатах.

Курение в рабочих помещениях запрещено.

Нежелательно, чтобы работающие в лаборатории имели бороду, во-первых, потому что в бороде могут сохраняться частички с бактериями и, во-вторых, потому, что маска или респиратор к чисто выбритому лицу прилегает гораздо лучше, чем к лицу с бородой.

Руки не следует подносить близко ко рту, носу, глазам, лицу и волосам, чтобы предотвратить самозаражение.

Личные вещи, такие, как пальто, шляпы, плащи, уличную обувь, зонты и кошельки, необходимо хранить вне лабораторных помещений.

После снятия защитных перчаток следует немедленно вымыть руки. Проверочные опыты показывают, что, даже когда используют перчатки, не исключено попадание на руки бактерий. Бактерии могут проникнуть через незаметные маленькие дырочки, трещины или разрывы, или попасть через край перчатки, прилегающий к запястью.

Руки нужно мыть, сняв запачканную защитную одежду, перед выходом из лаборатории, перед едой или курением и в течение дня через интервалы, определяемые характером работы. Желательно мыть руки в дезинфицирующем растворе или погружать их в него, но при этом, конечно, не следует допускать огрубения, чрезмерного высушивания или раздражения кожи.

К работе с бактериями нельзя допускать людей со свежим или старым порезом, ссадиной, повреждением кожи или любой открытой раной, включая образовавшуюся после удаления зуба.

Работа с пипетками. Чтобы уменьшить возможность заражения, следует использовать безопасные способы применения пипеток. Насасывание раствора пипеткой было причиной бактериального заражения в лабораторных условиях более чем в 17% всех известных случаев.

Наиболее распространенный способ, при котором подвергаются опасности в работе с пипеткой – это насасывание ртом. Бактерии могут также попасть в рот, если загрязненным пальцем дотронуться до верхнего конца пипетки. Кроме того, если в пипетках нет ватных пробок, то заражение может произойти путем вдыхания аэрозолей, возникающих в процессе работы с жидкими суспензиями, даже в том случае, когда жидкость не попадает в рот. Дополнительная опасность действия аэрозолей возникает, когда жидкость из пипетки капает на рабочую поверхность, перемешивают культуру чередованием всасывания и выдувания, интенсивно выдувают культуру в чашку или выдувают последнюю каплю из пипетки.

Чтобы использование пипеток было безопасным, применяют дополнительные приспособления, предотвращающие опасность заглатывания, и стараются обращаться с ними осторожно. Существует множество приспособлений к пипеткам – от простых шаровидных

груш и поршневых насосов до сложных конструкций, имеющих свои собственные насосы, создающие вакуум. При выборе приспособления надо иметь в виду тип операции, которую требуется выполнить, легкость выполнения, а также ее точность. Предварительно следует отработать технику использования пипеток, чтобы уменьшить возможность образования аэрозолей.

В верхнюю часть пипетки вставляют кусочки ваты и стараются избегать быстрого смешивания жидкостей путем чередования всасывания и выдувания их из пипеток. Нельзя с силой выдувать раствор из пипетки и допускать попадания пузырьков воздуха в жидкость, набираемую пипеткой. Предпочтительнее использовать пипетки, при работе с которыми не требуется выдувания последней капли. Необходимо также следить за тем, чтобы культуральный материал не капал из пипетки. Можно при работе с суспензиями, содержащими патогенные бактерии, на рабочую поверхность класть полотенце, пропитанное дезинфицирующим веществом. Жидкость из пипеток выливают таким образом, чтобы кончик пипетки находился почти над уровнем жидкости или агара в сосуде-приемнике или раствор стекал по его стенке. Пипетку с заразным материалом нельзя подносить близко к огню или проводить через пламя, так как в этом случае произойдет разбрызгивание материала из-за расширения объема, имеющегося в пипетке воздуха. Нельзя вносить раствор из пипетки в сосуд каплями, падающими с высоты. Грязные пипетки помещают в емкости с дезинфицирующим раствором, полностью погружая в него.

Центрифугирование. При центрифугировании инфекционных бактериальных суспензий следует пользоваться безопасными центрифужными гильзами, а настольные центрифуги должны находиться только в боксах.

Центрифужные стаканы и гильзы наполняют и открывают в безопасном боксе. Если центрифугируют вне бокса, то применяют защитную гильзу. После заполнения и запечатывания ее протирают или окунают в дезинфицирующий раствор. По истечении необходимого времени гильзу обмывают чистой водой, поскольку некоторые дезинфицирующие вещества вызывают коррозию.

Перед центрифугированием проверяют стаканы, и если находят трещины или сколотые края, то такими стаканами не пользуются. Внимательно осматривают внутреннюю поверхность гильз и ликви-

дируют шероховатости или приставшие частицы. Проверяют также состояние резиновых прокладок.

Между стаканом и гильзой заливают дезинфицирующий раствор, чтобы в том случае, если разобьется стакан, материал подвергся дезинфекции. К тому же это создает хорошую амортизацию. Следует позаботиться о том, чтобы культуральный материал не загрязнился дезинфицирующим веществом. Рекомендуются также не забывать о том, что если стакан разобьется, то из-за высокой концентрации клеток и большого разбавления дезинфицирующего вещества инфекционный материал может дезинфицироваться не полностью.

Надосадочную жидкость лучше не выливать из центрифужных стаканов, а отсасывать. Если ее необходимо слить, протирают внешний край стакана дезинфицирующим раствором, так как, если этого не сделать, на следующей стадии может образоваться аэрозоль.

Центрифужный стакан заполняют таким образом, чтобы край, крышка или ватная пробка не становились влажными от культуры. Завинчивающиеся крышки или крышки, охватывающие края сверху, безопаснее крышек, входящих внутрь. В последнем случае между крышкой и краем стакана обычно собирается некоторое количество жидкости. Даже стаканы с завинчивающимися крышками небезопасны: если края запачканы и неплотно прилегают к крышке, некоторое количество жидкости может попасть на внешнюю стенку стакана.

Не рекомендуется закрывать центрифужные стаканы алюминиевой фольгой, потому что при центрифугировании она часто слетает или рвется.

Стаканы и гильзы необходимо тщательно уравнивать. Не следует смешивать гильзы, стаканы и пластмассовые вкладыши из разных наборов. Если на этих предметах не указан вес, удобно пометить каждый комплект своей краской.

После включения центрифуги заданную скорость вращения достигают не сразу, а постепенно увеличивая число оборотов ротора. Крышку центрифуги открывают не ранее, чем через 20–30 минут после остановки ротора. Этим достигается полное осаждение аэрозоля, который образуется при центрифугировании в емкостях с заразным материалом, а в случае аварии – во всей камере центрифуги.

Металл, из которого сделаны высокоскоростные роторы, постепенно изнашивается, и если их используют на разных центрифугах, то для каждого заводят тетрадь, в которой отмечают количество часов работы на предельной или пониженной скорости. Если это не

соблюдается, может произойти опасная и дорогостоящая поломка. Чтобы предотвратить коррозию или другие дефекты, которые могут привести к развитию трещин, необходимы частые проверки роторов, их очистка и сушка. Если ротор обрабатывают дезинфицирующим раствором, то после этого его промывают водой и высушивают. Регулярно проверяют состояние резиновых колец и крышек центрифужных стаканов и смазывают их в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя. Если стаканы сделаны из различных материалов (например, целлулоидные, полипропиленовые, из нержавеющей стали), следят за тем, чтобы использовались крышки, предназначенные для соответствующих типов. Крышки часто внешне похожи, но если их надевают на несоответствующие им стаканы, последние могут давать течь. При хорошем хранении стаканов и роторов, и правильном с ними обращении, этого не происходит.

Перемешивание и разрушение микроорганизмов. При использовании для разрушения бактерий смесителей, миксеров, ультразвуковых дезинтеграторов, коллоидных мельниц, струйных мельниц, дробилок, а также ступок с пестиками, соблюдают следующие правила:

- Используют биологически безопасный бокс.
- Используют безопасное оборудование, в котором предотвращена утечка жидкости из сосуда. В случае отсутствия защиты от утечки перед работой необходимо убедиться в том, что ее нет. Для этого проводят предварительные испытания, используя стерильную воду, физиологический раствор или раствор метиленового синего.
- Во время работы на смеситель вешают полотенце, смоченное дезинфицирующим раствором. Сразу после работы смеситель и остатки стерилизуют.
- Для смешивания инфекционных материалов стараются не использовать стеклянные емкости.
- Иногда для предотвращения разрушения рабочих деталей и уменьшения нагревания содержимого требуется охлаждать емкость смесителя. После прекращения работы смесителя емкость не открывают, по крайней мере, в течение 1 мин, давая возможность осесть аэрозолю.

Применение вакуумных систем. Вакуумная фильтрация суспензий и отсасывание культуральных сред и надосадочных жидкостей из центрифужных стаканов в приемные колбы – это обычные лабораторные процедуры. Чтобы предотвратить засасывание бактериальных аэрозолей или забрасывание жидкости в вакуумную систему,

на пути к источнику вакуума устанавливают воздушный фильтр, а между приемной колбой и воздушным фильтром помещают колбу для забрасываемой жидкости.

Различные манипуляции. Водяные бани и бани с аппаратами Варбурга, используемые для инактивации, инкубирования бактерий или постановки опытов с ними, должны содержать дезинфицирующее вещество. Для бань с холодной водой рекомендуется использовать 70%-ный пропиленгликоль.

Предупреждение. В качестве дезинфицирующего вещества не следует применять азид натрия, так как он взрывоопасен.

Морозильники, сосуды с жидким азотом, контейнеры с сухим льдом и холодильники необходимо периодически проверять, чистить и обеззараживать. Во время их чистки пользуются резиновыми перчатками и защитными респираторами. Все инфекционные материалы, хранящиеся в холодильниках или морозильниках, снабжают этикетками.

Опасные жидкие культуры или жизнеспособные порошковые инфекционные материалы в стеклянных сосудах следует транспортировать, инкубировать и хранить в удобных для обращения небьющихся непроницаемых контейнерах, достаточно больших для того, чтобы вместить всю жидкость или порошок в случае утечки содержимого или разбивания стеклянного сосуда.

Засеянные среды в чашках Петри или твердые среды в других емкостях переносят и инкубируют в непроницаемых лотках или контейнерах.

Инструменты. Зараженные шприцы, инструменты, термометры, пипетки и стеклянная посуда перед новым использованием должны быть обеззаражены. Если возможно, конечную обработку следует проводить паром для жаропрочных предметов или окисью этилена для неустойчивых к нагреванию и чувствительных к влаге материалов. В тех случаях, когда перед употреблением необходимо обеззараживание, для дезинфекции используют раствор 2%-ного глутарового альдегида. Предметы полностью погружают в раствор на 20–30 мин. При этом полная безопасность не гарантируется, если предмет не был предварительно вымыт или если раствор уже использовали ранее. Перед повторным употреблением инструменты необходимо тщательно прополоскать в дистиллированной воде, а если они предназначены для работы в полости тела животного или на его поверхности, то в стерильной дистиллированной воде.

Лабораторные пипетки обеззараживают погружением в дезинфицирующий раствор, например, 2%-ный о-фенилфенол, налитый в вертикальную или горизонтальную емкость. Стекланную посуду погружают полностью. Перед использованием стекланную посуду стерилизуют паром.

Для обычного мытья рук в лаборатории, когда не имеют дела с инфекционными агентами, можно применять разные моющие средства. Тщательное мытье рук в течение 15–20 с дезинфектантом приводит к сокращению числа бактерий более чем на 50%.

Мыло в кусках использовать не рекомендуется не только из-за грязи в мыльнице, но также потому, что некоторые микроорганизмы сохраняют жизнеспособность на мыле в течение некоторого времени. Если в резервуар с жидким мылом не добавлять предохраняющих средств, то там могут постепенно вырасти многочисленные популяции бактерий. В этом случае резервуар следует вымыть обычным способом и налить туда новое мыло. Порошковые и листовые мыла имеют то преимущество, что они не загрязняются бактериями, и бактерии не способны расти на них.

Быструю дезинфекцию рук после загрязнения производят одним из следующих способов:

- 1) моют руки щеткой 30–60 с смесью дезинфектанта и детергента и ополаскивают их водой;
- 2) моют руки щеткой 30–60 с смесью 4%-ного хлоргексидина и детергента и ополаскивают водой;
- 3) моют руки 20–30 с смесью фенольного дезинфектанта и детергента и затем ополаскивают водой (некоторые фенольные производные при слишком частом использовании в слишком больших концентрациях могут вызвать депигментацию смуглой кожи);
- 4) смачивают руки спиртом (50–70%) на 20–30 с, затем моют их щеткой с мылом в течение 10–15 с и ополаскивают водой.

Вопросы

1. Какими способами возможно предотвращение заражения при работе в лаборатории?
2. Какие мероприятия применяются по предотвращению заражения людей и контаминации окружающего оборудования?
3. Какие методы безопасной работы с лабораторным оборудованием вам известны?

Тема 2. Биологические особенности дрожжей сахаромицетов

План проведения занятия

- 2.1. Изучение правил работы с микроскопом.
- 2.2. Методы исследования микроорганизмов в светлопольном микроскопе.

2.1. Изучение правил работы с микроскопом

Обращение с микроскопом требует навыков, поэтому, приступая к работе с ним, необходимо усвоить основные правила пользования микроскопом:

1. Вынимая из футляра микроскоп, его держат одной рукой за ручку штатива, а другой – поддерживают за ножку штатива. Наклонять микроскоп в сторону нельзя, так как при этом окуляр может выпасть из тубуса.

2. На рабочем столе микроскоп помещают ручкой к себе, на расстоянии 3–5 см от края стола. Перед началом работы следует осторожно мягкой сухой тканью удалить пыль с механических и оптических частей микроскопа, не касаясь пальцами линз.

3. Устанавливают правильное освещение поля зрения микроскопа. Для этой цели, смотря в окуляр, зеркалом направляют лучи света от настольного осветителя в объектив. Объекты, подлежащие микрофотографированию, рассматривают в проходящем свете. Настройка освещения производится с объективом 8. При правильной установке поле зрения микроскопа будет иметь форму круга, хорошо и равномерно освещенного.

4. На предметный столик помещают исследуемый препарат и закрепляют его клеммами.

5. Сначала препарат рассматривают с объективом 8, а затем переходят к большим увеличениям. Необходимо помнить, что чем меньше увеличение дает объектив, тем больше при установке препарата на фокус будет свободное рабочее расстояние (расстояние между объективом и препаратом).

6. Препарат рассматривают в нескольких местах, передвигая предметный столик боковыми винтами. При изучении препарата следует все время медленно (в пределах пол оборота) вращать микро-винт по часовой стрелке и против нее, чтобы просмотреть предмет во всей толще и установить на фокус то один, то другой участок препарата.

7. Перед переходом от одного объектива к другому место препарата, где расположен изучаемый объект, следует поставить точно в центр поля зрения и только после этого повернуть «револьвер» с объективом.

8. Во время микрокопирования необходимо держать оба глаза открытыми и пользоваться ими попеременно.

9. После окончания работы следует снять препарат с предметного столика, опустить конденсор, поставить под тубус объектив 8, удалить мягкой тканью иммерсионное масло с фронтальной линзы объектива 90 и убрать микроскоп в футляр.

2.2. Методы исследования микроорганизмов в светлопольном микроскопе

Микрокопированием определяют морфологические особенности микроорганизмов, их тинкториальные свойства, подвижность, наличие специальных структурных элементов (спора, капсула).

Приготовленные препараты «раздавленная капля» и «висячая капля» рассматривают с объективами 20^x или 40^x.

Фиксированные окрашенные препараты микрокопируют вначале с объективом 40^x, потом – с объективом 90^x. В правильно окрашенном и хорошо промытом препарате поле зрения остается светлым и чистым, а окрашенными оказываются клетки микроорганизмов.

Чтобы исследовать под микроскопом живые нефиксированные неокрашенные микроорганизмы, используют особые оптические системы: фазово-контрастное устройство и темнопольный конденсор.

Микроскопическое исследование микроорганизмов проводят в живых или фиксированных окрашенных препаратах.

Приготовление живых препаратов. Микроскопия клеток в живом состоянии применяется главным образом для изучения их размеров, формы, структуры, подвижности, характера размножения, отношения клеток к различным химическим раздражителям. С этой

целью наиболее часто готовят препараты «раздавленная капля» и «висячая капля». Микроорганизмы в этих препаратах можно подвергать прижизненной окраске. Так как большинство используемых в микробиологии красителей токсичны, для прижизненного окрашивания микроорганизмов их используют в очень малых концентрациях от 0,001 до 0,0001 %. В препарате «висячая капля» микроорганизмы можно наблюдать в течение продолжительного времени – неделю и более.

Готовят предметные и покровные стекла для микроскопии. Они должны быть чистыми и хорошо обезжиренными, чтобы нанесенная на них капля равномерно растекалась. Достигается это несколькими способами. Стекла можно прокипятить 15 мин в 1%-м растворе соды или в мыльной воде, сполоснуть водопроводной водой, поместить на 5–10 мин в слабую хлористоводородную кислоту и хорошо промыть дистиллированной водой. Можно также готовить стекла к работе, выдержав их предварительно 2 ч в концентрированной серной кислоте или хромовой смеси. После этого промыть их в проточной воде, прокипятить в 2 %-м растворе щелочи в течение 10 мин, тщательно промыть проточной, а затем дистиллированной водой. Обезжиренные предметные стекла можно приготовить, используя для этой цели кусочек мыла, которым необходимо натереть рабочую поверхность стекла, а затем тщательно вытереть ее сухой салфеткой. Чистые стекла поместить на хранение в сосуды с притертыми пробками в смеси равных объемов спирта и эфира или в 96%-й спирт.

Приготовление препарата «раздавленная капля». Для приготовления препарата на чистое и обезжиренное предметное стекло бактериологической петлей или пастеровской пипеткой наносят каплю исследуемой культуры. Если микроорганизмы находились в суспензии (в жидкой питательной среде), их наносят непосредственно на предметное стекло. Если же материал взят с плотной питательной среды, тогда его вносят в нанесенную предварительно на предметное стекло каплю стерильной водопроводной воды, стерильного физиологического раствора или какой-либо жидкой питательной среды. Можно также из культуры, выращенной на плотной питательной среде, предварительно приготовить суспензию микроорганизмов. Для этого в пробирку с микроорганизмами, выросшими на агаровой поверхности, вносят 45 см² стерильного физиологического раствора или водопроводной воды и, вращая пробирку между ладонями, смывают

микробные клетки с поверхности среды. Кроме того, можно в пробирку с 4–5 см³ стерильной воды бактериологической петлей перенести 1–2 колонии исследуемых микроорганизмов, выросших на агаре в чашке Петри.

На предметное стекло на край капли опустить ребром под углом 45° покровное стекло и, осторожно наклоняя, накрыть им каплю так, чтобы в ней не образовались пузырьки воздуха (рис. 16).

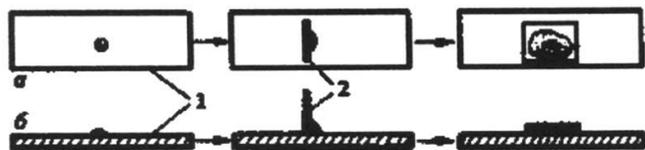


Рис. 16. Схема приготовления препарата «раздавленная капля»: а – вид сверху; б – вид сбоку; 1 – предметное стекло; 2 – покровное стекло

Каплю нужно брать такой величины, чтобы она заполняла все пространство между покровным и предметным стеклами и не выступала за края покровного стекла. Если жидкость будет нанесена в избытке, ее необходимо удалить при помощи полосок фильтровальной бумаги.

Приготовление препарата «Висячая капля». Для приготовления препарата «висячая капля» взять стекло со шлифованной лункой. Края лунки смазать вазелиновым маслом. На покровное стекло стерильно в центр нанести каплю исследуемого материала (рис. 17). Затем предметное стекло перевернуть лункой вниз и поместить на покровное стекло так, чтобы капля находилась в центре лунки, не соприкасаясь с ее краями. Предметное стекло легонько прижать к покровному и перевернуть. В образовавшейся герметичной камере капля не высыхает, что позволяет наблюдать за микроорганизмами продолжительное время.

Приготовление фиксированных препаратов. Фиксированный окрашенный препарат микроорганизмов готовят в несколько этапов: приготовление мазка, высушивание его, фиксация и окрашивание.

Мазки готовят на чистых обезжиренных предметных стеклах из микробных суспензий или из культур, выращенных на плотных питательных средах. Если необходимо изучить естественное расположе-

ние микроорганизмов в колониях, выращенных на поверхности плотной питательной среды или естественного субстрата, то готовят «препарат-отпечаток».

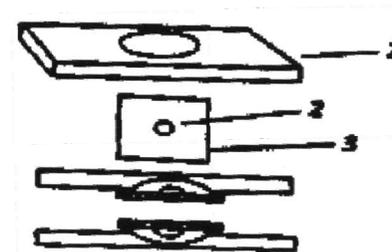


Рис. 17. Схема приготовления препарата «висячая капля»: 1 - предметное стекло с лункой; 2 - капля; 3 - покровное стекло

Высушивают мазки или «препараты-отпечатки» при комнатной температуре, так как высушивание при высокой температуре нарушает форму клеток.

На следующем этапе мазок фиксируют. При этом клетки прочно прикрепляются к поверхности стекла, повышается их сродство к красителям.

И, наконец, клетки гибнут. Самый простой и распространенный способ фиксации – фиксация жаром, пригоден для наблюдения морфологии клеток, но не для изучения их строения, так как при воздействии высоких температур структура клеток существенно изменяется. Помимо жира фиксацию можно проводить химическими веществами (жидкостями и парами). Для этого используют 96%-й этиловый спирт (время фиксации 5–10 мин), смесь Никифорова, состоящую из абсолютного этилового спирта и эфира в соотношении 1 : 1 (10–15 мин), безводный метиловый спирт (3–5 мин), ацетон (5 мин), пары параформальдегида и др. Для дрожжей приоритетными являются химические методы фиксации.

Для химической фиксации микроорганизмов чаще всего используют следующие химические растворы:

1. Жидкость Корнуа:

Ледяная уксусная кислота	– 10 см ³
Этиловый спирт, 96°	– 60 см ³
Хлороформ	– 30 см ³

Хранить жидкость следует в бутылках с притертой пробкой. Она может храниться длительное время, но лучше пользоваться свежеприготовленным раствором. Жидкость Карнуа является хорошим фиксатором для изучения строения бактерий. Экспозиция фиксации 15 мин.

2. Смесь Никифорова:

Этиловый спирт, 96° – 1 часть

Эфир – 1 часть

Для фиксации препарат погружают в стакан с жидкостью на 15–20 мин, после чего вынимают и дают возможность подсохнуть.

3. Спирт-формалин:

Этиловый спирт, 96° – 95 см³

Формалин – 5 см³

Для фиксации препарат погружают в стакан с жидкостью на 15 мин, после чего вынимают и дают возможность подсохнуть. После фиксации препарат окрашивают. Большинство красок, применяемых в микробиологической практике, представляют собой соединения, чаще всего производные бензола и его гомологов, которые получают либо путем химического синтеза, либо из каменноугольной смолы. Они могут быть основными, кислыми и нейтральными. В лабораторных условиях можно быстро определить, какой характер (кислый или основной) имеет водный раствор того или иного красителя. Для этого на фильтровальную бумагу наносят каплю исследуемой краски. Так как фильтровальная бумага заряжена отрицательно, то при основных свойствах краски вода растекается в виде бесцветной зоны вокруг фиксированного пятна краски, при кислых – краска и вода растекаются одинаково. Основные краски соединяются с веществами клетки, имеющими кислые свойства, а кислые – с веществами с основными свойствами. В практике микробиологических исследований чаще используются основные краски. Это объясняется тем, что большинство микроорганизмов несут на поверхности клетки отрицательный электрический заряд и в их цитоплазме преобладают вещества с кислыми свойствами. Исходя из сродства клеточных веществ к основному, кислому или нейтральному краскам, введены соответственно понятия базофилия, ацидофилия и нейтрофилия. Такое деление, однако, является относительным, так как большинство клеточных веществ являются амфотерными соединениями и в зависимости от значения рН среды могут приобретать кислые, нейтральные или основные свойства.

В микробиологической практике наиболее употребительными красками являются:

- *красные* – фуксин основной и фуксин кислый, нейтральный красный, конго красный, эозин К, эритрозин;
- *синие* – метиленовый голубой, толудиновый голубой;
- *зеленые* – малахитовый зеленый, бриллиантовый зеленый, янус зеленый;
- *фиолетовые* – генциан фиолетовый, кристаллический фиолетовый, гематоксилин;
- *коричневые* – основной коричневый, хризоидин;
- *желтые* – пикриновая кислота, флуоресцеин;
- *черные* – индулин спирторастворимый, нигрозин водорастворимый и др.

Использование разных красок, их концентрация и продолжительность воздействия на клетки обуславливается особенностями выявляемых структур и свойствами красителей.

Процедура приготовления фиксированного окрашенного препарата. С помощью стерильной бактериологической петли или пипетки Пастера нанести на тщательно обезжиренное предметное стекло каплю суспензии микроорганизмов. Материал с плотных питательных сред взять бактериологической петлей и внести его каплю стерильной водопроводной воды, предварительно нанесенную на предметное стекло. Микробный материал равномерно тонким слоем растереть на площади 1,5–2 см² и высушить приготовленный мазок при комнатной температуре.

После высушивания мазок зафиксировать в пламени горелки. Держа стекло мазком вверх, трижды пронести его через пламя горелки. Во избежание перегрева микроорганизмов время прямого воздействия пламени не должно превышать 3–4 секунды. Для лучшего сохранения морфологических параметров клетки целесообразно использовать химические методы фиксации.

Препарат поместить мазком вверх на мостик из двух параллельных стеклянных палочек, соединенных резиновыми трубками и находящихся на стенках кюветы.

Подготовленный таким образом препарат окрасить по методике, соответствующей поставленной задаче.

Препарат высушить на воздухе или легко промокнуть фильтровальной бумагой. Края стекла и тыльную сторону хорошо протереть салфеткой или фильтровальной бумагой.

Приготовленный таким образом препарат готов к микроскопированию.

Методы окраски микроорганизмов. Простая окраска микроорганизмов. Мазок, т.е. каплю эмульсии микроорганизмов, помещенную на предметное стекло, высушивают и фиксируют над пламенем горелки. Подготовленный препарат заливают 1–2 каплями краски (метиленовой синью Леффлера или фуксином Пфейфера), выдерживают 0,5–1 мин и смывают дистиллированной водой и микроскопируют.

Вопросы

1. Перечислите правила работы с микроскопом.
2. Назовите основные способы размножения дрожжей.
3. Какие существуют способы приготовления препаратов живых клеток микроорганизмов?

Тема 3. Питательные среды для дрожжей

План проведения занятия

- 3.1. Изучение состава питательных сред, используемых для культивирования дрожжей сахаромисетов.
- 3.2. Методы стерилизации питательных сред.

3.1. Изучение состава питательных сред, используемых для культивирования дрожжей сахаромисетов

Среда Сабуро. Основой этой среды является дрожжевая вода. На 1 л водопроводной (недистиллированной) воды берут 80 г прессованных пекарских дрожжей (или 20 г сухих дрожжей), кипятят 15 мин, фильтруют через бумажный фильтр, разливают по флаконам и стерилизуют при 1 атм 20 мин. К 100 мл стерильной дрожжевой воды добавляют 1 % пептона, 2% агара, нагревают до растворения агара, затем добавляют 4% глюкозы (или мальтозы), фильтруют, разливают в пробирки и стерилизуют при 0,5 атм 20 мин. После стерилизации среду в пробирках скашивают. Выращивание длится 48 ч при 22°C. Среду можно готовить и не на дрожжах, а на обычной 1% пептонной воде.

Жидкая среда Сабуро отличается от описанной выше тем, что не содержит агар-агара. Среду разливают в колбы по 150–200 мл, стерилизуют так же, как описано выше. Эта среда употребляется, главным образом, для получения гомокультуры.

Пивное сусло-агар. Неохмеленное пивное сусло – хорошая среда для некоторых молочнокислых и уксуснокислых бактерий, дрожжей, плесневых грибов и других представителей гетеротрофных микроорганизмов, использующих сахара в качестве источника углерода и энергетического материала. В сусле содержатся аминокислоты, элементы нуклеиновых кислот, витамины (в основном группы В), безазотистые органические кислоты, минеральные соли, большое количество углеводов (до 20%, из которых 80% составляет мальтоза), т.е. все, что необходимо для развития наиболее требовательных сапрофитных микроорганизмов.

Сусло готовят следующим образом. 250 г размолотого солода заливают 1 л водопроводной воды, нагревают до 48–50° и поддерживают эту температуру в течение получаса, непрерывно помешивая смесь, чтобы избежать образования комков. В последующие полчаса температуру поднимают до 55–58°С и поддерживают ее на этом уровне до полного осахаривания крахмала, т.е. до тех пор, пока реакция остывшей смеси с йодом будет отрицательной.

При указанном режиме происходит также гидролиз белков до аминокислот и полипептидов. Экстракт отфильтровывают через вату или бумажный фильтр. В фильтрате определяют концентрацию сахаров, пользуясь ареометром Баллинга, градусы (°Б) которого примерно соответствуют процентному содержанию сахара в растворе.

Неохмеленное пивное сусло разводят водопроводной водой до содержания сахара 7–8° по Баллингу (измеряют сахарометром) и стерилизуют в бутылках при 110°С 10 мин. В таком виде сусло может сохраняться длительное время. Перед употреблением над осадочную жидкость осторожно сливают с осадка. В 1 л стерильного сусла добавляют 18 г агар-агара, нагревают до растворения агара и разливают среду в стерильные пробирки, стерилизуют при 110°С 10 мин. Жидкое сусло после сливания отстоявшейся жидкости с осадка разливают в пробирки или колбы и стерилизуют при режиме, указанном для сусло–агара.

Рисовая среда Левиной (для быстрой идентификации *Candida albicans*). 20 г риса в зернах измельчают в ступке и заливают 500 мл дистиллированной воды, стерилизуют текучим паром 45 мин. Укрывают тепло и оставляют для отстаивания, затем фильтруют через 4 слоя марли. Осадок не отжимают. 20 г агар-агара расплавляют на открытом огне или текучим паром в 500 мл дистиллированной воды, фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Фильтрат агара смешивают с фильтратом риса и добавляют дистиллированной воды до 1 л. Стерилизуют при 1 атм (120°С) 20–30 мин. Разливают в чашки Петри, на которые производят прямой посев материала. Чашки с посевом плотно закрывают в 2 слоя бумаги и помещают при комнатной температуре или при 30°С на 18 ч. Результаты посева рассматривают под малым увеличением микроскопа непосредственно на чашке. Отмечают тип микроколоний (паукообразный, звездчатый, круглый и др.).

3.2. Методы стерилизации питательных сред

Стерилизация является заключительной операцией при приготовлении любой питательной среды. Питательные среды после разлива их в сосуды стерилизуют нагреванием – термостерилизацией. Перед стерилизацией посуды (колбы, пробирки) с налитыми в них средами закрывают ватными пробками предохраняющими их в дальнейшем от заражения микробами извне.

Стерилизация насыщенным паром под давлением. Такую стерилизацию проводят в автоклаве. Автоклав представляет собой двустенный металлический котел, герметично закрывающийся крышкой. Между стенками котла находится вода. Стерилизуемые объекты ставят на дно автоклава. Автоклав снабжен манометром, указывающим давление пара в котле, выпускным краном для выхода воздуха и пара и предохранительным клапаном, обеспечивающим выход пара при превышении заданного давления.

Автоклав обогревается газом или электричеством. Образующийся при кипении воды пар поступает в котел через отверстия, имеющиеся в верхней трети его внутренней стенки, и через выпускной кран выходит, вытесняя из автоклава воздух. После полного вытеснения воздуха (при этом выделяется сильная сплошная струя пара) выпускной кран закрывают, и в автоклаве постепенно повышается давление. Когда оно достигнет 1 атм (по манометру), подогрев регулируют, чтобы поддерживать давление на одном уровне в течение необходимого времени. При таком давлении водяной пар имеет температуру 120°С.

При этой температуре выдерживают питательные среды (если объем их не более 0,5–1 л) в течение 20–30 мин. При таком режиме стерилизации погибают не только вегетативные клетки микроорганизмов, споры плесеней и дрожжей, но и бактериальные споры. По окончании стерилизации выключают источник нагрева, после того как стрелка манометра снизится до нуля, осторожно открывают выпускной кран, чтобы вытеснить из автоклава пар. Крышку автоклава открывают лишь после того, как он охладится. Стерилизуют в автоклаве воду, мясopептонный бульон, дрожжевой афтолизат, агаровые и другие среды, которые не претерпевают заметных изменений при температуре 120°С.

Стерилизация текучим паром. Эта стерилизация бывает дроб-

ной, или последовательной. Она применяется чаще для питательных сред, которые могут заметно изменять свои свойства при стерилизации в автоклаве, например, молоко, среды, содержащие сахара, желатин.

Для стерилизации используется аппарат Коха (кипятильник Коха). Он представляет собой металлический цилиндр, покрытый изоляционным материалом, с двойным дном и неплотно закрывающейся крышкой, снабженной термометром. На дно цилиндра наливается вода. Над водой располагается металлическая подставка с отверстиями для прохождения пара, на которую помещают стерилизуемые питательные среды.

Вода в аппарате нагревается газом или электричеством до 100°C. Образующийся пар (текущий), прогревает стерилизуемые материалы, выходит через специальное отверстие и неплотности крышки.

Стерилизация производится дробно – в три приема, три дня подряд по 30 мин ежедневно. Повторная стерилизация, вызывается тем, что при температуре 100°C гибнут не все споры бактерий. В промежутках между нагревами (каждый – раз в сутки) питательная среда выдерживается в термостате при 25°C. За это время оставшиеся живыми споры прорастают в вегетативные клетки, которые и уничтожаются последующим нагревом при 100°C.

Холодная стерилизация (фльтрация). Метод холодной стерилизации применяется для жидких сред, которые не выдерживают нагревания.

Способ заключается в фильтровании сред через специальные мелкопористые бактериологические фильтры, задерживающие микроорганизмы (вирусы проходят). Фильтры изготавливаются из различных материалов из фарфоровой глины, асбеста, нитроклетчатки (мембранные ультрафильтры) и др.

Вопросы

1. Какие питательные среды используют для культивирования дрожжей?
2. Как приготовить питательную среду для дрожжей – Сабуро?
3. Как приготовить питательную среду для дрожжей солодовое сусло-агар?
4. Чем отличается состав жидких питательных сред от плотных?
5. Какие способы стерилизации питательных сред вы знаете?

Тема 4. Изучение морфологии дрожжей

План проведения занятия

- 4.1. Микрокопирование дрожжей.
- 4.2. Измерение клетки хлебных, винных или пивных дрожжей (сравнить и зарисовать).

4.1. Микрокопирование дрожжей

1. Для микрокопирования дрожжей приготовить препарат типа «раздавленная капля» из культур дрожжей, выращенных на питательной среде сусло или сусло-агар.

2. Промикрокопировать препараты с объективом 40^x при слабом освещенном поле зрения.

3. Рассмотреть и зарисовать форму клеток (рис. 18) и их строение, выявив оболочку, цитоплазму, вакуоли и включения запасных питательных веществ. Цитоплазма обнаруживается при микрокопировании как более темная зернистая масса, вакуоли – в виде светлых, прозрачных пятнышек, капли жира – светлые, блестящие (сильно преломляют свет), гликоген – в виде плотных зерен.

4. Для установления химической природы внутриклеточных включений применяют микрохимические реакции. Так, для выявления гликогена к капле дрожжей (винных или хлебных), перед тем как их накрыть покрывным: стеклом, добавляют каплю раствора Люголя. Гликоген окрашивается в красно-бурый цвет. Если гликогена в клетках нет или его мало, то значит дрожжи незрелые или старые.

Жир можно обнаружить путем добавления к капле дрожжей (круглых) каплю 0,5%-ного спиртового раствора краски судан III. Жир окрасится в красно-желтый цвет.

5. Убедиться в отсутствии подвижности дрожжей (приняв во внимание возможное перемещение клеток с током жидкости).

6. Найти и зарисовать почкующиеся клетки и сростки почкования, а у споробразующих дрожжей – клетки со спорами.

7. Для измерения дрожжевых клеток брать клетки непочкующиеся.

8. Результаты опыта записать.

4.2. Измерение клетки хлебных, винных или пивных дрожжей (сравнить и зарисовать рис. 18)

У шаровидных бактерий измеряют диаметр, у других форм – длину и ширину. Необходимо измерить 20–30 клеток, указать средние размеры и пределы колебаний. Можно определять размеры у окрашенных бактерий, но более точные данные получаются при измерении живых клеток, например, при фазово-контрастной микроскопии. Если клетки обладают подвижностью, то в среду добавляют 0,1% раствор агара.

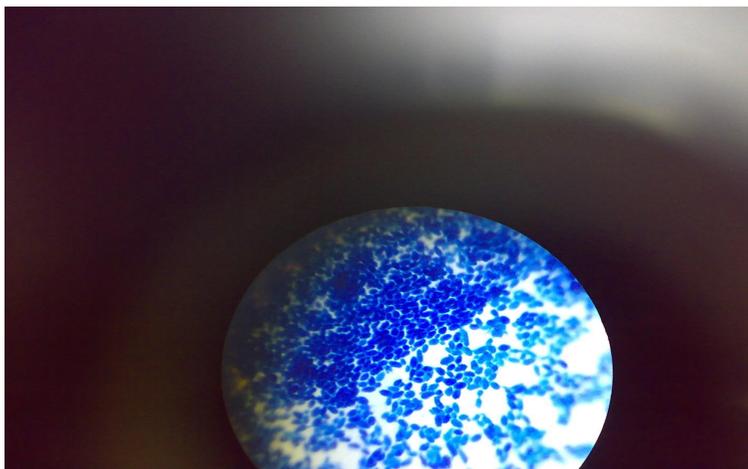


Рис. 18. Морфологические признаки одноклеточных грибов *Saccharomyces cerevisiae*

Для измерения используют окулярный микрометр и объективный микрометр. Окуляр-микрометр – это круглая стеклянная пластинка, в центре которой есть линейка длиной 5 мм, разделенная на 50 частей. При работе вывинчивают глазную линзу в окуляре, на диафрагму делениями вниз кладут окуляр-микрометр и снова собирают окуляр. Объект-микрометр – металлическая пластина с отверстием, в которое вставлено стекло с линейкой размером в 1 мм, которая разделена на 100 частей, т.е. одно деление равно 10 мкм.

Для определения цены деления окуляр-микрометра объект-микрометр кладут на предметный столик и совмещают шкалу окуляр-

микрометра и объект-микрометра, т.е. первые черты делений шкал. Затем определяют, сколько в делениях объект-микрометра вмещается делений окулярного микрометра. Например, в трех делениях объект-микрометра вместились 14 делений окуляр-микрометра, следовательно, одно деление окуляр-микрометра составляет 30 мкм: $14 = 2,14$ мкм. Можно при этом пользоваться формулой:

$$10 \cdot a/v = c,$$

где: a – количество делений объект-микрометра, совпадающих с делением окулярного микрометра; v – количество делений окулярного микрометра, совпадающих с делением объект-микрометра; c – величина одного деления окулярного микрометра.

После калибровки окуляр-микрометра на предметный столик помещают препарат и определяют размеры бактериальных клеток.

Например, палочковидная клетка занимает в длину 2 деления, а в ширину – 0,5 деления окуляр-микрометра. Если в нашем случае 1 деление окуляр-микрометра составляет 2,14 мкм, то размеры клетки будут: длина – $2,14 \times 2 = 4,28$ мкм, ширина – $2,14 \times 0,5 = 1,07$ мкм.

В работе удобен винтовой окулярный микрометр, который закрепляют на тубусе вместо окуляра. В окуляре винтового микроскопа смонтирована неподвижная шкала с ценой деления 1 мм и подвижная стеклянная пластинка с перекрестием. Она связана с микрометрическим винтом-барабаном и перемещается при его вращении. Цену деления барабана для каждого объектива определяют при помощи объект-микрометра: перекрестие подводят к началу одного деления объект-микрометра и отмечают деление на барабане. Далее вращают барабан, перемещая перекрестие до конца деления объект-микрометра, и вновь определяют деление на барабане. Вычисляют, скольким делениям микрометрического винта-барабана соответствует одно деление объект-микрометра. Например, 1 деление объект-микрометра, равное 10 мкм, соответствует X делениям микрометрического винта-барабана, следовательно, 1 его деление при данном увеличении микроскопа составляет $10:X$ мкм. При измерении длины микробной клетки вращением микрометрического винта-барабана перекрестие подводят к концу клетки и отмечают деление на барабане. Затем перекрестие подводят к другому концу клетки и снова отмечают деление на барабане. Определяют, скольким делениям микрометрического винта-барабана соответствует длина клетки, и умножают полученное число на цену деления барабана при данном увеличении микроскопа.

Вопросы

1. Как приготовить микроскопический препарат дрожжей?
2. Каковы форма, строение и размеры клеток дрожжей?
3. Какие способы размножения дрожжей вам известно?
4. Обладают ли дрожжи подвижностью?
5. Какова форма хлебных, винных и кефирных дрожжей?
6. Как обнаружить в клетках дрожжей гликоген и жир?

Тема 5. Получение элективной культуры дрожжей

План проведения занятия

- 5.1. Элективные среды для дрожжей.
- 5.2. Выделение чистой культуры дрожжей.

5.1. Элективные среды для дрожжей

Для обнаружения микроорганизмов в пищевых продуктах и других объектах, их выделения, изучения свойств и количественного учета часто требуется производить выращивание (культивирование) микроорганизмов, создавая условия, обеспечивающие интенсивное их размножение. Для выращивания микроорганизмов необходимо иметь питательные среды (субстраты).

В состав любой питательной среды должны входить в виде усвояемых соединений 10 химических элементов – С, Н, О, N (органические), P, S, K, Mg, Fe, Ca (зольные элементы), которые необходимы для развития всех микроорганизмов. Кроме того, микроорганизмы нуждаются и в других химических элементах – микроэлементах (Ni, Cu, Co, Zn и др.), но в значительно меньших количествах.

Питательная среда должна содержать достаточное количество воды, так как она является растворителем питательных веществ, которые в растворенном состоянии поступают в клетку путем осмоса. Вода является также источником водорода и кислорода. Для некоторых микроорганизмов необходимо присутствие в питательной среде витаминов.

Питательная среда должна иметь определенную реакцию (рН) благоприятную для выращиваемых микроорганизмов. Для большинства дрожжей – слабокислая.

В качестве питательных сред для микроорганизмов часто применяют естественные субстраты, которые содержат различные органические и минеральные вещества, необходимые для многих микроорганизмов.

Помимо естественных, применяют также искусственные среды, которые готовят из пищевых продуктов путем соответствующей об-

работки и введения в них каких-либо дополнительных веществ (например, сахара, пептона). Применяют и синтетические среды, которые представляют собой водные растворы определенных химических веществ в известной концентрации.

Универсальной питательной среды, на которой могли бы развиваться все микроорганизмы, не существует, ввиду разнообразия и специфичности требований их к источникам углерода, азота и других элементов. Однако имеются среды общеупотребительные (стандартные), на которых можно культивировать многие микроорганизмы.

Для выращивания отдельных видов или специфических групп микроорганизмов используют элективные (избирательные) среды, которые мало пригодны или вовсе не пригодны для большинства других микроорганизмов. На элективной среде из исследуемого материала, содержащего разнообразную микрофлору, определенные микроорганизмы удается изолировать от многих сопутствующих.

Известны дифференциально-диагностические среды, позволяющие различать (дифференцировать) микроорганизмы, основываясь на особенностях их обмена веществ.

Питательные среды различаются по физическому состоянию (консистенции). Они бывают жидкими и плотными (студнеобразными).

Наличие благоприятной питательной среды не является единственным условием для успешного выращивания микробов. Жизнедеятельность их протекает в тесной зависимости и от других факторов, например, от доступа воздуха.

Если микроорганизмы аэробы, т.е. используют в процессе дыхания кислород воздуха, то выращивание их производится при его доступе. Если микроорганизмы в процессе дыхания не используют кислород и наличие его сказывается даже неблагоприятно, то для выращивания таких анаэробных микроорганизмов пользуются различными приемами, ограничивающими доступ воздуха в питательную среду или даже исключаяющими его поступление. Их выращивают в питательной среде, налитой в сосуды высоким слоем, а для уменьшения диффузии кислорода из воздуха среду сверху заливают растительным или минеральным маслом слоем 1–1,5 см.

Все питательные среды непосредственно перед употреблением кипятят на водяной бане 20–30 мин для удаления из них воздуха.

Для выращивания строгих анаэробов пробирки, чашки Петри с посевами помещают в герметично закрывающиеся емкости, из ко-

торых воздух выкачивают насосом или вытесняют инертным газом (водородом, азотом). Воздух из сосудов можно и не удалять, а поместить в них химические поглотители кислорода (например, щелочной раствор пиригалола).

Анаэробные условия можно создать и при доступе воздуха к питательной среде, вводя непосредственно в нее легкоокисляющиеся вещества.

Температура окружающей среды – фактор, также определяющий возможность и интенсивность развития микроорганизмов. Различные микроорганизмы способны развиваться при различных температурах, в связи с чем их подразделяют на 3 группы: холодолюбивые, развивающиеся лучше всего при температуре около 10°C, теплолюбивые – при 50–60°C и мезофилы при средних температурах около 25–30°C.

В лабораторной практике соответствующие температурные условия для выращивания микроорганизмов создают в термостатах – специальных шкафах различного устройства, в которых с помощью терморегуляторов поддерживается постоянная температура.

5.2. Выделение чистой культуры дрожжей

Элективной (накопительной, или избирательной) называется культура, обогащенная одним определенным видом или определенной физиологической группой микроорганизмов.

В соответствии со свойствами искомым микроорганизмов подбирается специфическая питательная среда, степень ее аэрации, температура, значение pH. В таких элективных условиях среда обогащается теми микроорганизмами, для которых эти условия наиболее благоприятны. Другие микроорганизмы в этих условиях совсем не развиваются или их развитие происходит слабо. При культивировании микроорганизмов, например, при температуре 45–55°C преимущественно развиваются термофильные бактерии, в питательной среде с повышенным содержанием поваренной соли можно накопить галофильные микроорганизмы, создание анаэробных условий дает возможность вырастить лишь анаэробные микроорганизмы.

Из таких элективных культур можно получить чистые культуры данных микроорганизмов методом Коха, посевом в соответствующие агаризованные питательные среды.

Многие дрожжи являются возбудителями спиртового брожения – процесса разложения сахара с образованием этилового спирта и углекислого газа:



Дрожжи являются сапрофитами. Среди них есть факультативные анаэробы и аэробы. Оптимальная температура их развития 25–30°C, оптимальное значение pH среды 4–6. Они широко распространены в природе, встречаются в плодах, ягодах и других сахаросодержащих продуктах и могут вызывать их порчу (збраживание).

Получение элективной культуры дрожжей основано на способности их расти в сахаросодержащих субстратах со слабокислой реакцией и на их устойчивости к этиловому спирту.

Задание

1. В бродильную пробирку (пробирку с поплавком) со стерильным сусликом внести пинцетом 2–3 ягоды (виноград, изюм).
2. Пробирку закрыть ватной пробкой, наклеить этикетку с указанием фамилии студента и номера группы и поместить в термостат при 25–30°C.
3. Последовательность проведения опыта записать.

План проведения занятия (занятие второе)

1. Выявить накопление дрожжей по наличию в питательной среде осадка и характерных продуктов их жизнедеятельности.
2. Определить накопление дрожжей микроскопическим путем.

Методические указания

1. В пробирке с сусликом отметить наличие осадка, указывающего на размножение в среде микроорганизмов. Образование углекислого газа установить по накоплению газа в поплавке бродильной пробирки. Кроме того, его можно обнаружить и другим путем: на поверхности забродившего суслика в пробирке (или при встряхивании ее) образуется пена от выделяющегося углекислого газа. Образование спирта обнаруживают по алкогольному запаху забродившего суслика, который усиливается при нагревании.

2. Промикроскопировать осадок, образовавшийся в сусле, приготовив из него препарат типа «раздавленная капля».

3. Отметить, какие микроорганизмы преобладают в нем и зарисовать их.

Вопросы

1. Что такое элективная культура и как ее получают?
2. Что может служить питательной средой для дрожжей?
3. Каково отношение дрожжей к pH среды?
4. Что такое спиртовое брожение и каково его биологическое значение для дрожжей?
5. Как обнаружить продукты жизнедеятельности дрожжей?
6. Какие условия постановки опыта способствуют получению элективной культуры дрожжей?
7. В чем заключается практическое использование дрожжей?

Тема 6. Методы определения сухих веществ мелассы

План проведения занятия

- 6.1. Правила взятия проб мелассы.
- 6.2. Определение сухих веществ мелассы.
 - Рефрактометрический метод сухих веществ.
 - Определение содержания сухих веществ сахарометром.
- 6.3. Определение активной кислотности (рН) мелассы.

6.1. Правила взятия проб мелассы

Отбор проб. Пробы мелассы для анализа отбираются представителем отдела сырья или работником заводской лаборатории. Пробу отбирают в чистую сухую посуду из каждой прибывшей цистерны во время слива. Масса пробы составляет не менее 1,5 кг от каждых 10 т мелассы при приеме по массе и не менее 10 кг при приеме по объему. Из средней пробы отбирают в три чистые сухие бутылки по 0,5 л. Одну передают в лабораторию завода для анализа, две другие опечатывают печатью завода или пломбируют. На бутылки наклеивают этикетки с указанием наименования продукта, завода-отправителя, завода-получателя, номера цистерны, номера железнодорожной накладной, даты отбора пробы. Пробы хранят в течение 2 месяцев, а в случае разногласий – до окончания спора.

6.2. Определение сухих веществ мелассы

Рефрактометрический метод. Содержание сухих веществ при помощи рефрактометра определяют при температуре 20 °С. Если температура исследуемой пробы отклоняется от 20 °С, то в полученное значение необходимо ввести температурную поправку. Если при снятии показаний рефрактометра температура оказалась ниже 20 °С, то величину поправки вычитают из найденного количества. Если температура при определении выше 20 °С, то величину поправки следует прибавить к найденному количеству сухих веществ по соответствующим таблицам.

Для определения сухих веществ рефрактометром 2–3 капли мелассы, не разбавленной или разбавленной водой в соотношении 1:1, наносят на центральную часть нижней призмы рефрактометра при помощи стеклянной палочки. Верхнюю призму опускают и плотно прижимают к нижней неподвижной призме. Затем, путем передвижения окуляра, находят наиболее резкую границу между темной и светлой половиной поля зрения и отмечают по шкале процентное содержание сухих веществ.

Содержание сухих веществ в мелассе (разбавленной водой в соотношении 1:1), выраженное в процентах, равно удвоенному показанию рефрактометра.

Определение содержания сухих веществ сахарометром. Определение производят в растворе мелассы, разбавленной водой в соотношении 1:1. На технических весах тарируют стакан со стеклянной палочкой и взвешивают в нем 100 г исследуемой мелассы. К массе мелассы добавляют 60–70 см³ горячей дистиллированной воды и тщательно перемешивают. Смесь охлаждают до 20 °С, доводят дистиллированной водой (20 °С) до двойной массы мелассы (200 г), снова перемешивают и определяют в растворе содержание сухих веществ сахарометром.

Если при определении температура раствора имела отклонение от 20 °С, то в полученное значение необходимо ввести температурную поправку по соответствующим таблицам.

Содержание сухих веществ в мелассе, выраженное в процентах, равно удвоенному показанию сахарометра.

6.3. Определение активной кислотности (рН) мелассы

Активную кислотность (рН) мелассы определяют с помощью лабораторных рН-метров со стеклянными электродами. Для определения рН к навеске мелассы (20 г), взятой на техникохимических весах, добавляют 20 г дистиллированной воды, тщательно перемешивают и определяют рН раствора обычно при помощи лабораторных рН-метров, строго соблюдая инструкцию по эксплуатации к лабораторному рН-метру. Показания рН-метра записывают по истечении 3 мин после погружения электродов.

Вопросы

1. Как проводят отбор проб мелассы для исследований?
2. Какими способами определяют количество сухих веществ мелассы?
3. Определение активной кислотности (рН) мелассы?
4. Каково значение показателя активной кислотности (рН) мелассы, соответствующей требованиям дрожжевого производства?
5. Каково значение показателя количества сухих веществ в мелассе соответствующей требованиям дрожжевого производства?

Тема 7. Определение состава сахаров мелассы

План проведения занятия

- 7.1. Определение содержания сахарозы методом прямой поляризации.
- 7.2. Определение инверсионной поляризации.
- 7.3. Определение содержания инвертного сахара методом Офнера.
- 7.4. Расчет сахаристости (суммы сбраживаемых сахаров).

7.1. Определение содержания сахарозы методом прямой поляризации

Для количественного определения содержания сахаров в мелассе служат поляриметрические и химические методы. Общее содержание в ней сбраживаемых сахаров определяется по прямой и инверсионной поляризации. Кроме того, инвертный сахар определяют химическим методом (по Офнеру).

Две с половиной навески мелассы (65 г) при помощи дистиллированной воды переводят без потерь в колбу вместимостью 250 см³, где вместе с ополосками должно быть 150 см³. Полученный раствор охлаждают до 20°C и осветляют раствором азотнокислого свинца (340 г в 1 дм) и гидроокиси натрия (32 г в 1 дм³). Осветлители сохраняют отдельно. На осветление раствора мелассы расходуется 30–50 см³ каждого из растворов. Для лучшего осветления и большей точности результатов анализа осветляющие реактивы следует вводить по частям (в 4–6 приемов). После чего содержимое колбы доводят дистиллированной водой почти до метки, удаляют пену каплей эфира, доливают водой точно до метки при температуре 20°C и фильтруют.

С целью удаления избытка свинца на каждые 100 см³ полученного фильтрата в колбу прибавляют 0,3 г сухого измельченного порошка однозамещенного фосфата аммония (NH₄H₂PO₄). Для его растворения жидкость энергично взбалтывают, после чего прибавляют на каждые 100 см³ фильтрата по 0,2 г гидросульфита натрия (Na₂S₂O₄) или бисульфита натрия (NaHSO₃). Затем раствор перемешивают и оставляют на 20 мин, снова взбалтывают и фильтруют. Полученный

раствор является исходным для определения прямой и инверсионной поляризации инвертного сахара.

Осветленный раствор наливают в трубку высотой 200 мм и поляризуют в сахарометре при температуре 20 °С. Для каждой пробы проводят три отсчета и принимают средний. Полученная величина и есть прямая поляризация раствора.

7.2. Определение инверсионной поляризации

Для определения суммы сбраживаемых сахаров в мелассе производят инверсионную поляризацию, используя фильтрат, полученный для прямой поляризации.

Отбирают 50 см³ фильтрата, полученного для определения сахарозы по прямой поляризации, соответствующие 13 г мелассы, переводят их в колбу вместимостью 100 см³, добавляют туда же 30 см³ раствора соляной кислоты (одна часть соляной кислоты относительной плотности 1,19 и пять частей воды по объему). Вращательным движением колбы перемешивают содержимое, опускают в раствор термометр и помещают колбу в водяную баню, предварительно нагретую до температуры 75 °С.

Колбу устанавливают не на дно бани, а на фарфоровую или металлическую вставку с круглыми вырезами.

Температуру воды в бане поддерживают в пределах 70–72 °С, нагревая жидкость в колбе в течение 2,5–3 мин до 67–69 °С и поддерживая эту температуру в течение 5 мин. После этого колбу из бани вынимают и быстро (не более 2,5 мин) охлаждают под краном до 20 °С. Весь процесс инверсии должен быть проведен в течение 10 мин.

После охлаждения раствора термометр вынимают и ополаскивают водой, доводят содержимое колбы до метки, тщательно взбалтывают, фильтруют и поляризуют в трубке длиной 200 мм точно при 20 °С. Удвоенное показание поляриметра дает инверсионную поляризацию (И). В случае отклонения температуры при поляризации раствора от 20 °С следует вносить поправку на температуру по формуле:

$$I_{20} = I - 0,0038 \cdot (П + И) \cdot (20 - t),$$

где: П и И – инверсионная и прямая поляризация, %; t – температура.

7.3. Определение содержания инвертного сахара методом Офнера

Из осветленного раствора, оставшегося после определения прямой поляризации, отбирают пипеткой 10 см³ (соответствующие 2,6 г мелассы), переводят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доливают дистиллированной водой до метки. Отбирают пипеткой 25 см³ разбавленного таким образом раствора (соответствующего 0,65 г мелассы), переводят в коническую колбу вместимостью 150 см³ и прибавляют 25 см³ реактива Офнера.

В смешанный раствор добавляют немного талька в порошок или грубо измельченной пемзы. Колбу ставят на асбестовую сетку с вырезанными в центре отверстиями диаметром около 6,5 см и нагревают на газовой горелке или спиртовке в течение 4–5 мин до начала кипения, затем уменьшают пламя так, чтобы оно едва касалось сетки, и поддерживают умеренное кипение точно 7 мин, по истечении которых содержимое колбы охлаждают до 20 °С в холодной воде, не взбалтывая во избежание окисления осадка. При нагреве на электрической плитке кипение регулируют, включая и выключая плитку.

7,5 см³ 1 М раствора соляной кислоты, отмеренного градуированным цилиндром, осторожно вливают по стенкам колбы в охлажденный раствор, чтобы растворить находящийся на стенках осадок, и сразу же после добавления кислоты прибавляют к испытываемому раствору из бюретки 20 см³ 0,0323М раствора йода.

Колбу закрывают стеклянной или корковой пробкой и оставляют на 2 мин, периодически перемешивая содержимое колбы вращением. Ровно через 2 мин оттитровывают избыток йода, в колбе 0,0323М раствором гипосульфита. В конце титрования, когда раствор станет светло-желтым, в него добавляют 2,5 см 0,5%-го раствора крахмала и титруют до перехода окраски от синей в зеленую или бронзовую.

Одновременно проводят контрольный опыт (с тем же количеством раствора мелассы, реактивом йода, что и в основном опыте, но без кипячения) для установления поправки на окисляемость йодом веществ, находящихся в растворе.

По разности между количеством гипосульфита, которое потребовалось на титрование в рабочем и контрольном опытах, устанавливают количество связанного йода. Исходя из того, что 1 см 0,0323М раствора йода эквивалентен 1 мг инвертного сахара, содержание инвертного сахара определяют по формуле:

$$I_c = (V_1 - V_2) \cdot 100/1000 \cdot N,$$

где: I_c – содержание инвертного сахара к массе мелассы, %; V_1 , V_2 – соответственно объем 0,0323М раствора гипосульфита в контрольном и рабочем опыте, см³; N – навеска мелассы, г.

Пример. Для определения инвертного сахара к 25 см³ раствора, полученного разведением в 10 раз (10:100), подготовленного для поляризации (соответствующего 0,65 г мелассы), прибавили 20 см³ 0,0323 М раствора йода. На титрование избытка йода затратили 14,6 см³ 0,0323 М раствора гипосульфита. На то же количество йода в контрольном опыте израсходовали 19,4 см³ гипосульфита. Следовательно, количество йода, вступившего в реакцию, будет равно 4,8 см³ (19,4–14,6), т.е. в 0,65 г мелассы содержится 4,8 мг инвертного сахара или в процентах к массе:

$$I_c = (19,4 - 14,6) \cdot 100/1000 \cdot 0,65 = 0,74 \text{ \%}.$$

7.4. Расчет сахаристости (суммы сбраживаемых сахаров)

Сахаристость рассчитывают по формуле:

$$C_{об} = 0,68 - П + 0,96 \cdot И + 0,80 \cdot I_c,$$

где: $C_{об}$ – сахаристость мелассы, %; $П$ и $И$ – абсолютные значения прямой и инверсионной поляризации, %; I_c – содержание инвертного сахара, определенное химическим методом (по Офнеру).

Пример

$$П = 49,2 \text{ \%}; \quad И = 16,0 \text{ \%}; \quad t = 20 \text{ }^\circ\text{C}; \quad I_c = 0,4 \text{ \%};$$

$$C_{об} = 0,68П + 0,96И + 0,80I_c = 0,68 \cdot 49,2 + 0,96 \cdot 16 + 0,8 \cdot 0,4 = 49,1 \text{ \%}.$$

Для более полной оценки качества мелассы, поступившей на дрожжевые заводы, определяют содержание сахарозы и рафинозы в ней по формулам:

$$C_{сах} = 0,5124 \cdot (П + 0,31 \cdot I_c) + (И - 0,31 \cdot I_c) / 0,8474;$$

$$Р = (49,2 + 0,31 \cdot I_c) - C_{сах} / 1,852,$$

где: $C_{сах}$ и $Р$ – содержание сахарозы и рафинозы в мелассе, %; $П$ и $И$ – абсолютные значения прямой и инверсионной поляризации; $0,31 \cdot I_c$ – поправки на вращательную способность инвертного сахара I_c , определяемого химическим методом.

Пример

$$П = 49,2 \text{ \%}; \quad И = 16,0 \text{ \%}; \quad t = 20 \text{ }^\circ\text{C}; \quad I_c = 0,4 \text{ \%};$$

$$C_{сах} = 0,5124 \cdot (49,2 + 0,31 \cdot 0,4) + (16,0 - 0,31 \cdot 0,4) / 0,8474 = 48,6 \text{ \%}.$$

$$Р = (49,2 + 0,31 \cdot 0,4) - 48,6 / 1,852 = 0,39 \text{ \%}.$$

Вопросы

1. Как определяют содержания сахарозы методом прямой поляризации?
2. Как проводится определение содержания инвертного сахара?
3. Каково значение показателя количества суммы сбраживаемых сахаров в мелассе соответствующей требованиям дрожжевого производства?

8.2. Определение содержания общего азота

Общий азот в мелассе определяют по методу Кьельдаля, основанному на окислении органических веществ концентрированной серной кислотой при нагревании. Содержание общего азота в мелассе может колебаться в пределах от 0,8 до 2,2 %. Для определения азота по Кьельдалю берут от 1,5 до 2,5 г мелассы. Навеску отвешивают на аналитических весах в пробирке, которую вводят в колбу Кьельдаля, и выливают содержимое. При этом наблюдают, чтобы частицы испытуемого вещества не прилипали к горлышку колбы. Массу мелассы, взятую для анализа, определяют по разности между массой пробирки с навеской и массой пробирки после выливания мелассы. В эту же колбу с мелассой наливают 20–30 см концентрированной химически чистой серной кислоты (относительной плотностью 1,84) и дают кислоте хорошо пропитать мелассу в течение 2 ч (лучше 8–10 ч), чтобы избежать вспенивания в процессе сжигания.

Для ускорения сжигания в колбу добавляют катализаторы. Наилучшим катализатором при сжигании органических веществ в серной кислоте является селен, которого достаточно добавить несколько крупинок. В качестве катализаторов применяют также сернокислый калий (по 1–1,5 г на каждые 10 см³ серной кислоты) и сульфат меди (0,5–1 г).

Горло колбы неплотно закрывают специальной стеклянной пробкой с расширением. Для кипячения колбу ставят в наклонное положение на сетке, чтобы ее длинное горло не нагревалось. Это горло служит воздушным холодильником; кипячение кислоты не должно быть слишком бурным, чтобы ее пары успевали сконденсироваться в горле колбы.

После того, как жидкость перестанет пениться и выделение белых пятен сернистого газа станет более равномерным, нагревание усиливают. Обугленные частички смывают со стенок колбы содержащейся в ней жидкостью, которая к концу реакции обесцвечивается или при сжигании с сульфатом меди приобретает голубую окраску. После полного просветления жидкости нагревание продолжают еще в течение 1 ч, при этом избегают бурного кипения и следят за тем, чтобы горло колбы сильно не нагревалось. После окончания сжигания навески в содержимом колбы определяют количество аммиака, для чего его перегоняют в колбу с титрованным раствором серной кислоты.

Тема 8. Определение доброкачественности и содержание азота в мелассе

План проведения занятия

- 8.1. Определение доброкачественности.
- 8.2. Определение содержания общего азота.
- 8.3. Определение аминного азота «медным способом».
- 8.4. Определение усвояемого азота (формольное число).

8.1. Определение доброкачественности

Доброкачественность – это отношение сахара к общему количеству сухих веществ, выраженное в процентах. Она рассчитывается по формуле:

$$Д = С \cdot 100 / СВ,$$

где: Д – доброкачественность мелассы, %; С – содержание сахара в мелассе, %, по прямой поляризации (если сумма сбраживаемых сахаров превышает количество сахара, полученное по прямой поляризации, более чем на 1 %, то содержание сахара в мелассе считают по сумме сбраживаемых сахаров); СВ – содержание сухих веществ в мелассе, %.

Пример

С = 48 %, СВ – 80 %.

Д = 48 · 100 / 80 = 60 %.

Доброкачественность мелассы, используемой в дрожжевом производстве, составляет 55–65 %, т.е. на 100 массовых частей сухого вещества мелассы должно приходиться 55–65 массовых частей сахара. Хорошо перерабатывается меласса с невысокой доброкачественностью (58–60 %).

При доброкачественности более 65 % в мелассе имеется избыток сахара и недостаток нес сахаров, что препятствует активному размножению дрожжей. При доброкачественности ниже 55 % в мелассе отмечают, как правило, низкое содержание сахара (39–44 %) и пониженная активная кислотность (рН 5–6,5). Такая меласса плохо хранится, и в ней могут протекать различные микробиологические и биохимические процессы.

Содержание общего азота X вычисляют по формуле:

$$X = 0,0014 \cdot (aK_1 - EK_2) \cdot 100 / H,$$

где: a – количество 0,1 М раствора серной кислоты в приемной колбе, см³; K_1 – поправочный коэффициент серной кислоты; E – количество 0,1 М раствора гидроксида натрия, которое потребовалось на титрование избытка раствора серной кислоты, см³; K_2 – поправочный коэффициент гидроксида натрия; 0,0014 – количество азота, соответствующее 1 см³ 0,1 М раствора серной кислоты; H – навеска мелассы, г.

Пример

На сжигание взято 2,3716 г мелассы. В приемник налито 50 см³ 0,1 М раствора серной кислоты с поправочным коэффициентом $K_1 = 0,9961$. На обратное титрование израсходовано 23,4 см³ 0,1 М раствора гидроксида натрия с поправочным коэффициентом $K_2 = 1,0126$. Таким образом, связано аммиаком $50 \cdot 0,9961 - 23,4 \cdot 1,0126 = 26,2352$ см³ 0,1 М раствора серной кислоты.

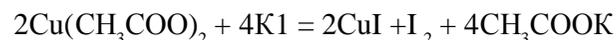
Содержание общего азота X в мелассе составит:

$$X = 0,0014 \cdot (50 - 0,9961 - 23,4 - 1,0126) \cdot 100 / 2,3716 = 1,54\%.$$

8.3. Определение аминного азота «медным способом»

Содержание азота аминокислот в мелассе колеблется от 0,1 до 0,5 %. Простым и быстрым методом определения количества азота аминокислот является «медный способ». Метод основан на способности аминокислот образовывать комплексные растворимые соединения с медью, содержание которой определяют йодометрическим способом.

Сущность метода заключается в следующем. К определенному количеству испытуемого раствора, содержащего смесь аминокислот прибавляют при слабощелочной реакции избыток суспензии фосфорнокислой меди в боратно-буферном растворе, в результате чего после взбалтывания в раствор переходят медные соли большинства аминокислот. Затем избыток фосфата меди отфильтровывают и в прозрачном растворе после добавления уксусной кислоты и йодистого калия определяют медь объемным способом по выделившемуся йоду, путем титрования гипосульфитом в соответствии с реакцией:



Каждый 1 см³ 0,01 М раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ соответствует 0,28 мг аминного азота.

Ход определения заключается в следующем. 13 г навески мелассы разбавляют дистиллированной водой в мерной колбе на 100 см³. Из полученного раствора отбирают 5 см³ в мерную колбочку на 25 см³, добавляют 1 М раствора едкой щелочи до бледно-синего окрашивания (индикатор тимолфталеин) и 15 см³ суспензии фосфорнокислой меди, затем доводят водой содержимое колбы до метки. После фильтрования отбирают 5 см³ полученного фильтрата, добавляют 0,25 см³ 80% уксусной кислоты и 0,5 г йодистого калия.

Выделившийся йод оттитровывают из микробюретки 0,01 М раствором гипосульфита (индикатор крахмал). Содержание азота X определяют по формуле:

$$X = 0,28 \cdot a \cdot K \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot 100 / H - V_2 \cdot b \cdot 1000,$$

где: X – содержание азота, %; 0,28 – количество аминного азота, эквивалентное 1 см³ 0,01 М раствора гипосульфита, мг; a – объем 0,01 М раствора гипосульфита, затраченный на титрование, см³; K – поправочный коэффициент гипосульфита; H – навеска мелассы, взятая на анализ, г; V_1 – объем разбавленной мелассы, см³; V_2 – количество разбавленной мелассы отобранной на осветление, см³; V_3 – объем осветленного раствора, см³; b – количество фильтрата осветленной мелассы, взятое на определение, см³; 100 – пересчет в проценты; 1000 – перевод миллиграммов в граммы.

8.4. Определение усвояемого азота (формольное число)

Формольное число указывает на наличие в среде усвояемого азота, необходимого для формирования белка клетки. Таким образом, недостаток азота в среде тормозит синтез биомассы, скорость роста дрожжей при этом понижается. Для обеспечения высокой скорости роста дрожжей надо соблюдать оптимальную величину ф.ч. (формольного числа). В период интенсивного роста дрожжей ф.ч. составляет на стадии получения засевных дрожжей 1,0–1,5 см³ 0,1 М NaOH. В случае снижения его в период интенсивного роста до 0,5 см³ следует срочно вводить в культуральную среду сульфат аммония или аммиачную воду в зависимости от pH среды. В конце процесса ф.ч. понижается до 0,1–0,2 см³ 0,1 М NaOH после дозревания. Количество усвояемого азота в среде определяют формольным титрованием.

Ход определения: 10 мл бражки разбавляют 90 мл дистиллированной воды и титруют 0,1 н раствором NaOH с фенолфталеином до слабо-розового окрашивания. Затем туда же наливают 5 мл нейтрального 40% формалина и титруют вторично тем же раствором NaOH опять до слабо-розового окрашивания.

Число мл 0,1 р-ра NaOH пошедшее на вторичное титрование характеризует формольное число испытуемой жидкости. Эта величина относительная и показывает количество растворенного в среде аммонийного и аминного азота.

Вопросы

1. Как определить доброкачественность мелассы?
2. Каково значение показателя доброкачественности мелассы соответствующей требованиям дрожжевого производства?
3. Как определить содержания общего азота?
4. Каково значение показателя содержания общего азота мелассы соответствующей требованиям дрожжевого производства?
5. Как определить количество аминного азота «медным способом»?
6. Что такое формольное число?
7. Каково значение показателя формольного числа мелассы соответствующей требованиям дрожжевого производства?

Тема 9. Анализ золы мелассы

План проведения занятия

- 9.1. Определение содержания золы в мелассе.
- 9.2. Определение содержания калия при сухом озолении.
- 9.3. Ускоренный метод определения калия кобальт-нитритом натрия в азотнокислой среде (ВНИИХП).
- 9.4. Определение суммы солей кальция и магния.
- 9.5. Определение содержания магния.

9.1. Определение содержания золы в мелассе

В предварительно прокаленную и взвешенную платиновую или фарфоровую чашку (тигель) кладут около 3 г мелассы. Навеску обливают 1–2 см³ серной кислоты относительной плотности 1,84, размешивают платиновой проволокой или оплавленной стеклянной палочкой, вытирают проволочку или палочку маленьким кусочком фильтровальной бумаги, который также бросают в чашку, и, держа чашку щипцами, осторожно нагревают на небольшом пламени горелки под тягой. Когда меласса перестанет пениться и выделение паров газов прекратится, ее окончательно сжигают и прокаливают до постоянной массы в муфеле при слабом калении или на горелке, при этом доводят платиновую чашку или тигель до слабо-красного каления.

Сжигание считается законченным, когда вся масса превратится в белый или розовый порошок, не содержащий черных частиц несгоревшего вещества. Затем чашку или тигель переносят в эксикатор, охлаждают и взвешивают.

Пример

Масса пустого прокаленного тигля 17,9632 г; масса тигля с навеской мелассы 20,9306 г; масса тигля с золой 18,2204 г; навеска мелассы 2,9674 г; масса золы 0,2572 г.

Количество углекислой золы

$$0,2572 \cdot 0,9 = 0,2314 \text{ г.}$$

Содержание золы в мелассе

$$0,2324 \cdot 100/2,9674 = 7,8 \text{ \%}.$$

Содержание золы в мелассе колеблется от 6 до 13%.

9.2. Определение содержания калия при сухом озолении

В фарфоровую чашку, предварительно прокаленную и доведенную до постоянной массы, кладут такое количество веществ, чтобы после озоления навеска золы соответствовала примерно 0,2 г.

К навеске золы приливают в фарфоровую чашку 25–30 см³ воды и нагревают на водяной бане 5 мин. Полученный раствор охлаждают, прибавляют 1–2 капли фенолфталеина (1%-го спиртового раствора) и, приливая по каплям приблизительно полунормальную азотную кислоту, нейтрализуют раствор до обесцвечивания. Если от прибавления фенолфталеина порозовения раствора не наблюдается, то кислоту не прибавляют. Фарфоровую чашку с содержимым снова ставят на водяную баню, нагревают до проявления интенсивной окраски и к нагретому раствору приливают (по каплям) 3–4 капли 0,05 М раствора азотнокислого серебра для осаждения хлора.

Жидкость перемешивают, фильтруют в мерную колбу емкостью 50 см³ и несколько раз промывают малыми количествами горячей воды. К фильтрату прибавляют каплю метилового оранжевого и 0,5 М раствора азотной кислоты до порозовения раствора (2–3 капли), после чего его охлаждают в струе холодной воды и доводят до метки.

Затем в химический стаканчик вместимостью 50–100 см³ пипеткой вносят 5 см осаждающего раствора Тананаева. Затем в стаканчик из колбочки приливают пипеткой 25 см анализируемого раствора. Взяв стаканчик в левую руку и слегка вращая его (для лучшего взаимодействия), правой рукой держат пипетку, из которой приливают испытываемый раствор.

Опорожнив пипетку, содержимое стаканчика перемешивают стеклянной палочкой в течение 2 мин, спустя 5 мин продолжают перемешивать еще 1 мин, после чего оставляют содержимое стаканчика на 1–2 ч в покое в темном месте (лучше оставить на ночь).

Результаты анализа будут неточными, если в 25 см исследуемого раствора окажется меньше 3,5 см³ или больше 40 мг калия, что должно быть учтено при определении величины навески. Пока осадок отстаивается, тарируют чистый, высушенный при 110 °С стеклянный фильтрующий тигель (ТФ-4-20) и с помощью каучуковой пробки или кольца плотно закрепляют его в горле колбы Бунзена, соединенной с насосом.

Одновременно готовят промывалку с дистиллированной, подкисленной уксусной кислотой. Спустя 2 ч через тигель сначала сливают жидкость над осадком, а затем переносят на фильтр и сам осадок, взбалтывая его в стаканчике при помощи промывной жидкости, наливаемой из промывалки. При этом частицы осадка, приставшие к стенкам стакана, следует снимать стеклянной палочкой с резиновым наконечником и смывать в тигель. Осадок промывают в тигле до тех пор, пока фильтрат не станет совершенно бесцветным. Достигнув этого, тигель с резиновым кольцом переносят в другую чистую колбу Бунзена и промывают 3–5 см³ этилового спирта. Затем тигель снова переносят в чистую колбу Бунзена и промывают осадок 2–3 см³ эфира.

Пример

Исходная навеска мелассы равна 1,0386 г. На осаждение калия отобрана половина указанной навески (1,0386 : 2 = 0,5193 г) мелассы. Масса осадка равна 0,0914 г. Для расчета калия, содержащегося в навеске мелассы, массу осадка умножают на коэффициент, найдя его в табл. 10.

Таблица 10 – Коэффициенты и масса осадков для расчета калия, содержащегося в навеске мелассы

Масса осадка, г	Коэффициент	Масса осадка, г	Коэффициент
0,2800-0,3325	0,1196	0,0875-0,1300	0,1145
0,2270-0,2800	0,1186	0,0660-0,0875	0,1138
0,1735-0,2770	0,1155	0,0446-0,0660	0,1128
0,1300-0,1725	0,1155	0,0220-0,0446	0,1124

Массе осадка, равной 0,0914 г, соответствует коэффициент, равный 0,1145. Умножая массу осадка на 0,1145, получаем массу калия X в навеске, равную 0,0104 г.

$$X = 0,0104 \cdot 100 / 0,5193 = 2 \%$$

В пересчете на K₂O это составит:

$$94,2 \cdot 2 / 78,2 = 2,4 \%$$

где: 94,2 – молекулярная масса K₂O; 78,2 – масса двух атомов калия.

Количество K_2O в золе будет:
 $2,4 \cdot 100/7,2 = 33,3 \%$,
где: 7,2 – содержание золы в мелассе в %.

9.3. Ускоренный метод определения калия кобальт-нитритом натрия в азотнокислой среде (ВНИИХП)

На аналитических весах в химическом стаканчике взвешивают 4–5 г мелассы, переводят ее в мерную колбочку вместимостью 100 $см^3$, доводят дистиллированной водой до метки, взбалтывают и фильтруют в сухую колбочку.

В химический стаканчик отбирают пипеткой 10 $см^3$ раствора мелассы, добавляют 1,1 $см^3$ 1 М раствора азотной кислоты и 5 $см^3$ 20%-го свежеприготовленного раствора кобальтнитрита натрия, перемешивают палочкой и оставляют стаканчик с палочкой на 2 ч в темном месте.

Через 2 ч выпавший осадок кобальтнитрита калия фильтруют под разряжением через высушенный при 105 °С и взвешенный стеклянный фильтр ТФ-4-20, установленный в колбе Бунзена, переводя осадок на фильтр 0,01 М раствором азотной кислоты. После этого осадок на фильтре промывают 10 раз той же кислотой по 2 $см^3$ и 5 раз 86–95%-м этанолом, отсасывают почти досуха, вытирают снаружи фильтр и высушивают в течение часа при 105–110 °С. Фильтр с осадком охлаждают в эксикаторе и взвешивают на аналитических весах. Так как в осадке кобальтнитрита калия калий составляет 17,22%, для расчета его содержания полученную массу осадка умножают на 0,1722 и пересчитывают на 100 г мелассы по формуле:

$$X = (a - B) \cdot 0,1722 \cdot 100 - 100/1 \text{ OH} = (a - B) \cdot 17,2/Н,$$

где: X – содержание калия, %; a – масса фильтра ТФ-4-20 с осадком после высушивания, Б – масса фильтра ТФ-4-20 без осадка, г; (a – Б) – масса полученного осадка, г; Н – взятая навеска мелассы, г.

Пример

Масса фильтра с осадком a = 11,9635 г; масса фильтра без осадка Б = 11,8725 г; взятая навеска мелассы Н = 5,0425 г.

$$X = (11,9635 - 11,8725) 17,2/5,0425 - 0,0910 - 17,2/5,0425 = 3,06\%.$$

$$K_2O = 3,06 \cdot 1,2046 = 3,69 \%$$

Для подготовки стеклянных фильтров для дальнейших анализов осадок смывают и кипятят фильтры в дистиллированной воде 30 мин.

Затем воду сливают и в каждый фильтр наливают крепкой серной кислоты (фильтры устанавливают в химическом стакане). Спустя 1 ч кислоту сливают, фильтры промывают, кипятят в чистой воде 30 мин и промывают до полного удаления кислоты. Чистый фильтр высушивают при 105 °С до постоянной массы.

9.4. Определение суммы солей кальция и магния

Содержание кальциевых солей в мелассе колеблется от 0,2 до 2,5 % в пересчете на CaO, окиси магния MgO – от 0,001 до 1,2 %. Навеску мелассы в количестве 1 г или определенный объем раствора мелассы помещают в коническую колбочку вместимостью 200–250 $см^3$, в которую добавляют определенный объем дистиллированной воды (100 $см^3$).

Пробу хорошо размешивают вращательным движением колбочки и к полученному раствору добавляют 5 $см^3$ аммиачного буферного раствора. Затем из бюретки добавляют избыток (10–15 $см^3$) комплексообразователя трилона Б (н/28) и 7–8 капель индикатора хромогена-черного, после чего жидкость окрашивается в зеленый цвет. Эту жидкость титруют из другой бюретки магниезиальной смесью (н/28) до появления винно-красного цвета, который образуется вследствие полного связывания ионов калия и магния.

Для определения количества солей кальция и магния в дистиллированной воде, которая была добавлена в коническую колбочку вместимостью 200–250 $см^3$, наливают 100 $см^3$ дистиллированной воды и таким же способом определяют содержание в ней солей кальция и магния.

Количество трилона Б, которое потребовалось на титрование 100 см дистиллированной воды, вычитают из общего количества трилона Б, израсходованного при определении солей кальция и магния в навеске мелассы или в растворе.

Содержание солей кальция и магния вычисляют по формуле:

$$X = (aK - \bar{b}) - (a_1 - K_1)/100/Н \cdot 100,$$

где: a – общее количество трилона Б, $см^3$; a_1 – количество трилона Б, пошедшее на титрование воды, $см^3$; K – поправочный коэффициент трилона Б; \bar{b} и \bar{b}_1 – количество магниезиальной смеси, пошедшее на обратное титрование контроля и опыта, $см^3$; Н – навеска испытуемого продукта, г; 1000 – коэффициент для пересчета миллиграммов в граммы.

Пример

1 г мелассы растворяют в 100 см³ дистиллированной воды. К полученному раствору мелассы из бюретки добавляют 10 см³ трилона Б (н/28), поправочный коэффициент равен 0,99. На обратное титрование израсходовано магниальной смеси 8,5 см³ (поправочный коэффициент равен 1). Трилона Б на связывание ионов кальция и магния израсходовано:

$$10 \cdot 0,99 - 8,5 = 9,9 - 8,5 = 1,4 \text{ см}^3.$$

При определении содержания солей кальция и магния в 100 см³ дистиллированной воды потребовалось 2 см³ трилона Б (н/28), поправочный коэффициент К равен 0,99. На обратное титрование магниальной смеси (н/28) израсходовано 1,8 см³ (K = 1).

$$2 - 0,99 - 1,8 = 1,98 - 1,8 = 0,18.$$

Содержание кальциевых и магниевых солей X (в % к массе мелассы) определяют по формуле:

$$X = (10 \cdot 0,99 - 8,5) - (2 \cdot 0,99 - 1,8) \cdot 100/1 \cdot 1000 = 0,122\%.$$

Для определения содержания солей кальция в мелассе применяют прямой метод определения содержания магния в мелассе и полученное его количество вычитают из суммы солей (Ca + Mg), рассчитанной приведенным выше способом.

9.5. Определение содержания магния

Навеску мелассы 0,5 г переносят со 100 см³ дистиллированной воды в колбу вместимостью 250 см³, хорошо размешивают до полного растворения мелассы, нейтрализуют несколькими каплями соляной кислоты (1:1) до окрашивания бумажки конго в сине-фиолетовый цвет.

Для осаждения ионов кальция добавляют 5–10 см³ насыщенного раствора щавелевокислого аммония, энергично взбалтывают 2–3 мин и оставляют на холоде в течение 15–20 мин. Затем добавляют 10 см³ аммиачного буферного раствора, 10–15 см³ комплексообразователя трилона Б (0,05 М), сухого индикатора хромогена-черного (на кончике стеклянной палочки) и титруют 0,05 м раствором сернокислого магния до перехода окраски индикатора из зеленого в оранжево-красный.

Содержание магния X рассчитывается по формуле:

$$X = (aK - B) \cdot 1,008 \cdot 100/N \cdot 1000,$$

где: X – количество MgO, %; a – количество трилона Б, взятое на определение, см³; K – поправочный коэффициент трилона Б; B – количество 0,05 М раствора сернокислого магния, пошедшее на титрование, см³; N – навеска мелассы, г; 1000 – перевод миллиграммов в граммы; 1,008 – коэффициент перевода см³ трилона Б в MgO (1 см³ 0,05 М раствора трилона соответствует 1,008 мг MgO).

Вопросы

1. Как определить содержание золы в мелассе?
2. Как определить содержание калия при сухом озолении?
3. Сущность ускоренного метода определения калия.
4. Как определить суммы солей кальция и магния?
5. Как определить содержание магния?

Тема 10. Методы определения цветности мелассы, буферности мелассы и расхода серной кислоты для осветления мелассы

План проведения занятия

- 10.1. Определение цветности мелассы.
- 10.2. Определение буферности мелассы.
- 10.3. Определение расхода серной кислоты для осветления мелассы.

10.1. Определение цветности мелассы

В заводской химической лаборатории в каждой партии мелассы обычно определяют содержание сахара, белка, азота, инвертного сахара, а также значения добротности, плотности, кислотности и цветности. Из всех перечисленных характеристик только цветность мелассы не может быть откорректирована на заводах, не имеющих участка с современной технологией очистки и стерилизации мелассы. Осаждение пленок пигментов на клеточной поверхности происходит вследствие различий электрических зарядов: заряд клетки отрицательный, а коллоидов – положительный. Хорошим решением вопроса предотвращения осаждения пигментов на клеточную поверхность могло бы быть изменение кислотности среды инкубации в нейтральную сторону. Этим пользуются при выращивании товарных дрожжей – процесс завершают (последний час) при рН 6,0, когда клетки сбрасывают значительную часть окрашенной пленки коллоидов и товарные дрожжи получают светлого тона, что является положительным. Дрожжевые клетки при рН 6,0 растут хорошо, но эти же значения активной кислотности близки к оптимальным значениям кислотности для размножения посторонней микрофлоры. Поэтому без гарантированно стерильного производства дрожжей в целом кислотность в ферментерах поддерживают на минимально допустимом для дрожжей уровне – рН 4,5, при котором скорость роста посторонней микрофлоры значительно снижена, а дрожжи растут еще эффективно.

Цветность определяют путем сравнения окраски 2%-го раствора мелассы с окраской раствора йода и выражают ее в см³ 0,1 М ра-

створа йода. Обычно цветность нормальной мелассы соответствует 2 см³ раствора йода.

Взвешивают в химическом стакане 20 г мелассы и при помощи горячей дистиллированной воды смывают ее в мерную колбу вместимостью 100 см³. Раствор после охлаждения доводят до метки. 10 см³ этого раствора разводят в мерной колбе вместимостью 100 см³ в 10 раз, доливая содержимое колбы до метки водой, взбалтывают и фильтруют. 50 см³ фильтрата помещают в стаканчик, в другой стаканчик такого же объема наливают 47 см³ дистиллированной воды. Стаканчик ставят против света. В стаканчик с водой наливают из бюретки 0,1 М раствора йода до выравнивания окраски жидкости в обоих стаканчиках.

Количество см³ 0,1 М раствора йода умножают на 2, чтобы выразить цветность мелассы по отношению к 100 см³ 2%-го ее раствора.

10.2. Определение буферности мелассы

Буферность – это свойство мелассы противостоять изменению реакции (рН) под влиянием кислоты или щелочи. Буферность зависит от состава не сахаров и их количества в мелассе, главным образом от соотношения солей калия, натрия, кальция и магния, а также от количества аминного азота.

Определение буферности мелассы происходит следующим образом: на технических весах в стаканчике вместимостью 100 см³ отвешивают 25 г мелассы, добавляют 25 см³ дистиллированной воды и тщательно перемешивают до полного растворения мелассы. В растворе определяют рН. Затем из бюретки постепенно приливают 1 М раствор серной кислоты и определяют его количество, необходимое для изменения рН мелассного раствора до 4,5 или 5. Израсходованное количество 1 М раствора серной кислоты умножают на 4, получают ее расход на 100 г мелассы.

Мелассы с нормальной буферностью характеризуются постепенным снижением рН мелассного раствора в пределах 7–5 при затрате на титрование по 0,8–0,6 см³ 1 М раствора серной кислоты, а до рН 4 (при дополнительном расходе 0,6–0,5 см³ 1 М раствора серной кислоты).

При повышенной буферности мелассы, для снижения рН в пределах 7–5, требуется 1,2–2,3 см³ 1 М раствора серной кислоты, а для

снижения pH до 4 рекомендуется 2–4 см³ 1 М раствора серной кислоты.

Буферность мелассы имеет значение при осветлении ее по холодно–кислотному способу и подкислении до pH 4,5–5. Для мелассы нормальной буферности расход серной кислоты меньше.

10.3. Определение расхода серной кислоты для осветления мелассы

На технических весах в стаканчике вместимостью 100 см³ взвешивают 25 г мелассы, добавляют 25 см³ дистиллированной воды, перемешивают до полного растворения мелассы и определяют pH раствора. Затем из бюретки приливают постепенно 1 М раствор серной кислоты и определяют ее количество, необходимое для сдвига pH мелассного раствора до значения 4,5–5.

Расход серной кислоты на 1 т мелассы вычисляют, исходя из найденного количества 1 М раствора серной кислоты, затраченного на титрование 25 г мелассы.

Пример

На титрование 25 г мелассы израсходовано 6,9 см³ 1 М раствора серной кислоты, что соответствует $6,9 \cdot 0,049 = 0,338$ г 100%-ной концентрированной серной кислоты, а на 1 кг мелассы расход серной кислоты составит $0,338 \cdot 1000/25 = 13,5$ г; на 1 т мелассы потребуется 13,5 кг 100%-ной серной кислоты или 14,4 кг (относительной плотностью 1,83).

Вопросы

1. Что понимают под буферностью мелассы?
2. Как определить буферность мелассы?
3. Как определить цветность мелассы?
4. Как определить расход серной кислоты для осветления мелассы?

Тема 11. Определение содержания летучих кислот

План проведения занятия

- 11.1. Определение содержания летучих кислот методом отгонки с водяным паром.
- 11.2. Определение содержания сернистого ангидрида.

11.1. Определение содержания летучих кислот методом отгонки с водяным паром

К летучим кислотам мелассы относятся масляная, муравьиная, уксусная, валериановая, пропионовая. Эти кислоты в свободном состоянии даже в небольших количествах (0,006–0,008 %) угнетают рост дрожжей. Большинство летучих кислот в мелассе находятся в форме солей, которые менее вредны, чем свободные кислоты.

Содержание летучих кислот в свекловичной мелассе колеблется в пределах от 0,33 до 1,15 %. Оно не должно превышать 1,2 %. Количественное определение летучих кислот в мелассе основано на разложении солей этих кислот серной или фосфорной кислотой, с последующей их отгонкой с водяным паром и определением их в дистилляте титрованием щелочи.

Для определения берут 20 г мелассы и растворяют в 200 см³ дистиллированной воды в колбе вместимостью 500 см³, в которую прибавляют по каплям (до окрашивания в синий цвет бумажки конго-рот) 0,5–1,0 см³ серной кислоты (относительной плотностью 1,84) или 1,0 см³ фосфорной кислоты (относительной плотностью 1,66) и закрывают ее резиновой пробкой. В пробке имеется два отверстия, через которые проходят стеклянные трубки: одна соединяется с парообразователем и доходит почти до дна колбы, а другая кончается у нижнего края пробки и соединяется с холодильником. Эта трубка служит для отвода дистиллята из колбы в приемную колбу вместимостью 250 см³. В качестве парообразователя применяют или специальный медный (или жестяной) сосуд, или стеклянную колбу вместимостью 2–3 дм³.

Парообразователь закрывают пробкой с длинной стеклянной трубкой, доходящей до дна сосуда. Эта трубка служит предохранителем

для предотвращения случайного повышения давления в процессе работы. Сначала воду в парообразователе нагревают до кипения, затем его соединяют с перегонной колбой, содержимое которой предварительно подогревают. Летучие кислоты отгоняют при одновременном подогревании колбы и парообразователя. Нагревание парообразователя регулируют так, чтобы объем жидкости в отгонной колбе не увеличивался вследствие конденсации поступающего пара и оставался постоянным. Отгоняют 5–6 порций дистиллята по 200 см³ и титруют каждую партию 0,1 М раствором гидроксида натрия в присутствии фенолфталеина.

Отгонку летучих кислот заканчивают при получении двух, следующих одна за другой порций дистиллята, имеющих одинаковую кислотность. Из количества щелочи, пошедшего на титрование каждой порции отгона, вычитают количество щелочи, израсходованное на титрование последней порции. Полученное таким образом количество щелочи, затраченное на титрование каждой порции, кроме последней, складывают, умножают на 5 и на 0,006 и получают количество летучих кислот в 100 г мелассы в пересчете на уксусную кислоту.

Содержание летучих кислот в мелассе X (в %) определяют по формуле:

$$X = VK \cdot 0,006 \cdot 100/N,$$

где: X – содержание летучих кислот в мелассе, %; V – количество 0,1 М раствора гидроксида натрия, затраченное на титрование каждой порции, кроме последней, см³; K – поправочный коэффициент к 0,1 М раствору гидроксида натрия; 0,006 – содержание уксусной кислоты, соответствующее 1 см³ раствора гидроксида натрия, г; 100 – пересчет на проценты; N – навеска мелассы, г.

Пример

Количество 0,1 М раствора гидроксида натрия, затраченное на титрование каждой порции, кроме последней, равно 31,1 см³, поправочный коэффициент к щелочи ИГ = 1,0052, навеска мелассы $N = 20$ г.

Подставляя значения в формулу, определяют содержание летучих кислот в мелассе:

$$X = 31,1 \cdot 1,0052 \cdot 0,006 \cdot 100/20 = 0,937\%.$$

11.2. Определение содержания сернистого ангидрида

Содержание сернистого ангидрида в мелассе не должно превышать 0,05 %. Наличие сернистого ангидрида в мелассе тормозит рост

дрожжей, а прессованные дрожжи, выращенные на такой мелассе, имеют свойство быстро изменять свое качество и темнеть при хранении.

Сущность метода определения состоит в окислении йодом сернистой кислоты в серную.

Колбу для отгона, вместимостью 500 см³, закрывают каучуковой пробкой с двумя отверстиями. В одно отверстие вставляют воронку для ввода исследуемой жидкости, другое отверстие сообщается посредством каплеуловителя с одним концом холодильника, другой конец которого должен быть опущен в приемную колбу.

В колбу для отгона наливают 20 г мелассы, разбавляют 250–300 см³ воды и добавляют 15 см³ 25%-го раствора ортофосфорной кислоты. В приемную колбу отмеривают точно 25 см³ 0,1 М раствора йода и помещают в баню со льдом.

Конец холодильника погружают в йодный раствор, дистилляцию ведут на медленном огне. Отгонку продолжают до тех пор, пока половина жидкости не будет отогнана до прекращения выделения пузырьков газа. Общая длительность отгонки должна быть не менее 2,5 ч. Затем холодильник смывают дистиллированной водой. В приемной колбе количество йодного раствора, не вошедшее в реакцию, титруют 0,1 М раствором гипосульфита в присутствии нескольких капель 1%-го крахмала.

Одновременно для установления поправки на окисляемость йодом находящихся в растворах веществ проводят глухой опыт с таким же количеством реактивов, но без навески мелассы. Продолжительность глухого опыта должна соответствовать продолжительности отгонки.

Содержание сернистого ангидрида X в мелассе определяют по формуле:

$$\begin{aligned} & ((VK_1 - V_1K_1) - (V_1K_1 - V_2K_2)) \cdot 0,0032 \cdot 100/N = \\ & = (V_2 - V_1) \cdot K_2 \cdot 0,0032 \cdot 100/N, \end{aligned}$$

где: X – содержание сернистого ангидрида, %; V – количество 0,1 М раствора йода, см; K_1 – поправочный коэффициент к 0,1 М раствору йода; V_1 – количество 0,1 М раствора гипосульфита, израсходованного на титрование, см³; V_2 – количество 0,1 М раствора гипосульфита, израсходованного в глухом опыте, см³; K_2 – поправочный коэффициент к 0,1 М раствору гипосульфита; 0,0032 – содержание SO₂, соот-

ветствующее $1 \text{ см}^3 0,1 \text{ М}$ раствора йода, г; 100 – пересчет в проценты; Н – навеска мелассы, г.

На анализ всегда берут 20 г мелассы и $25 \text{ см}^3 0,1 \text{ М}$ раствора йода. Подставляя эти величины в уравнение, получаем его упрощенным:

$$X = (V_2 - V_1) - K_2 \cdot 0,016.$$

Пример. Для определения SO_2 взято 20 г мелассы, в приемную колбу добавлено $25 \text{ см}^3 0,1 \text{ М}$ раствора йода. При титровании израсходовано $22,4 \text{ см}^3 0,1 \text{ М}$ раствора гипосульфита с поправочным коэффициентом $K_2 = 1,0197$. Поправочный коэффициент $0,1 \text{ М}$ раствора йода $K_2 = 1$. На глухой опыт израсходовано $24,1 \text{ см}^3$ гипосульфита.

Подставляя значения в формулу, определяют содержание сернистого ангидрида в мелассе

$$X = (24,1 - 2,4) - 1,0197 - 0,016 - 0,027\%$$

Вопросы

1. Как проводится определение содержания летучих кислот?
2. Как проводится определение содержания сернистого ангидрида?

Тема 12. Сушка дрожжей

План проведения занятия

- 12.1. Сушка дрожжей в шахтной сушилке ВИС-42Д.
- 12.2. Сушка дрожжей в виброкипящем слое.
- 12.3. Сушка дрожжей под вакуумом.
- 12.4. Сушка методом сублимации.

12.1. Сушка дрожжей в шахтной сушилке ВИС-42Д

Сушеные дрожжи выгодно отличаются от прессованных способностью длительно сохраняться в том случае, если они высушены до остаточной влажности 5–8 % и при этом в них сохранены исходные ферментные свойства. В герметичной упаковке они могут сохранять активность в течение нескольких лет при хранении при комнатной температуре. Сохранность сушеных дрожжей обусловлена качеством прессованных дрожжей, режимом сушки и герметичностью упаковки.

Прессованные дрожжи, предназначенные для сушки, не должны содержать посторонней микрофлоры, обладать пониженной активностью протеолитических ферментов. В результате применения различных рас и специализированных режимов выращивания дрожжи для прессования и для сушки имеют различный состав. Так, дрожжи, предназначенные для сушки, содержат значительно больше сухих веществ (32–34 %) по сравнению с прессованными (30–31 %), а также больше собственных углеводов, в частности трегалозы – 11–12 % против 7–8 % у дрожжей, направляемых на прессование.

Известно, что трегалоза является энергетическим субстратом эндогенных процессов у дрожжей, и сушеные дрожжи с высоким содержанием трегалозы значительно дольше сохраняют активность, чем дрожжи, бедные трегалозой. Кроме того, трегалоза является регулятором внутриклеточного осмотического давления, при увеличении которого синтез ее активизируется.

Для получения дрожжей, устойчивых к высушиванию, их выращивают на высококонцентрированных средах с КЯ не более 14 и пониженной удельной скоростью роста.

Прессованные дрожжи, предназначенные для сушки, должны выращиваться по особой технологии, обеспечивающей необходимые показатели их качества.

Влага в дрожжах состоит из внеклеточной и внутриклеточной влаги.

Внеклеточная влага составляет 15–28 %.

Для отделения и вывода влаги теплоносителем парциальное давление паров в воздухе должно быть меньше, чем парциальное давление на поверхности высушиваемого материала. Если их значения равны, высушивание прекращается, если давление паров воздуха выше, дрожжи увлажняются.

Основным условием сушки является поддержание температуры дрожжей на уровне 30 °С.

Процесс обезвоживания проходит в три стадии:

I – снижение влажности до 52 % (удаление внеклеточной влаги);

II – уменьшение влажности от 52 до 16–18 % (удаление свободной внутриклеточной влаги);

III – снижение влажности с 16–18 до 8–7,5 % (удаление части связанной внутриклеточной влаги).

Остаточная влага (7–8 %) является химически связанной, и дальнейшее ее удаление приведет к денатурации белков, а следовательно к гибели клетки. Если же влажность окажется более высокой, например до 10 %, то в клетках будут продолжаться реакции обмена, которые приводят к их автолизу и потере хлебопекарных свойств товарной продукции.

Для сохранения ферментативной способности дрожжей особенно важно форсировать сьем влаги в первый период сушки. Температура теплоносителя в этот период может быть достаточно высокой, от 50 до 140 °С, в зависимости от интенсивности сушки. При этом температура дрожжей не превышает критических пределов вследствие «самоохлаждения» за счет потерь тепла на испарение влаги (скрытая теплота парообразования). Чем интенсивнее идет сьем влаги, тем выше может быть температура теплоносителя. Наибольшая интенсивность влагоотдачи наблюдается в сушилках с виброкипящим слоем.

Скорость воздуха обычно находится в пределах 1–2,5 м/с, при увеличении скорости от 1 до 2 м/с продолжительность сушки уменьшается на 30–40 %. При скорости воздуха около 4 м/с слой влажных дрожжей в виде гранул различных размеров переходит во взвешенное состояние.

Качество сушеных дрожжей и их способность сохранить ферментативную активность в процессе хранения тем выше, чем быстрее проходит высушивание.

Для ускорения процесса влагоудаления дрожжи измельчают в формовочных машинах либо в гидравлических прессах и подают на сушку в виде гранул или вермишели диаметром около 1 мм. Применяются сушилки различных конструкций.

Сушка дрожжей в шахтной сушилке ВИС-42Д. Дрожжи сушат в непрерывном потоке. Подготовленную дрожжевую вермишель раскладывают на полки с помощью специальной каретки. Далее продукт пересыпается с полки на полку, проходя две зоны сушки: верхнюю (11 полок) при температуре 80–95 °С и нижнюю (9 полок) при температуре не более 63 °С. Конструкцией сушилки предусмотрена возможность самостоятельного регулирования продолжительности сушки в каждой зоне. Оптимальная длительность сушки в верхней зоне 55 мин (5 мин на каждой полке), в нижней зоне – 90 мин (10 мин на каждой полке). Общая длительность сушки 2,5–5 ч.

12.2. Сушка дрожжей в виброкипящем слое

На сушилках непрерывного действия итальянской фирмы «Прессиндустрия» дрожжи сушат в виброкипящем слое, применяют мягкий режим. Нагрузка на 1 м² сита не должна превышать 84 кг.

Сушилка непрерывного действия производительностью 80–100 кг/ч. В установке выполняются следующие операции: гранулирование прессованных дрожжей, подготовка сушильного агента, сушка гранулированных дрожжей, передача сушеных дрожжей на упаковку и улавливание дрожжей (пыли) из отработанного воздуха в батарее циклонов. Сушка дрожжей осуществляется в виброкипящем слое. Температура входящего воздуха в I и II зоне 60 °С, в III – 42–48 °С, а в IV зоне – 36–39 °С.

Температура отработанного воздуха в I и II зонах 25–28 °С, а в IV зоне – 29–30. °С.

12.3. Сушка дрожжей под вакуумом

В сушилках шведской фирмы СИА активный сьем влаги происходит в начале высушивания при атмосферном давлении и темпера-

туре воздуха 50 °С в течение 6–7 ч, содержание влаги доводится до 15–22 %. Досушивание производится под вакуумом.

Высушенные дрожжи через сепаратор поступают в конвейер, откуда направляются на упаковку. Дрожжи, высушенные таким образом, отличаются хорошей подъемной силой (45–70 мин) и повышенной стойкостью при хранении.

12.4. Сушка методом сублимации

Сущность метода заключается в удалении влаги путем возгонки льда из замороженного продукта по схеме; жидкость – твердая фаза (лед) – пар. Структура исходного материала при этом сохраняется почти без изменений. Высушенный продукт отличается значительной дисперсностью и пористостью. Последнее обуславливает быстрое восстановление первоначальных свойств при увлажнении.

В результате проведенных в МТИППе работ установлено, что сушка дрожжей сублимацией обеспечивает лучшее сохранение активности ферментов, лучшие пористость, цвет, вкус, стойкость при хранении и обводняемости, чем при тепловой сушке.

Упаковка и хранение сушеных дрожжей. Сушеные дрожжи, по сравнению с прессованными, сохраняют свою ферментативную активность более продолжительное время, так как процессы жизнедеятельности клеток в обезвоженном продукте значительно затормаживаются, но не прекращаются совсем. При этом инактивируются бродильные ферменты, протекают процессы автолиза, в результате чего ухудшается подъемная сила дрожжей.

Для сохранности сушеных дрожжей большое значение имеет их упаковка. В настоящее время, в дрожжевой промышленности, в качестве упаковочных материалов, используют жестяные банки, некоторые виды полимерных пленок, лакированный целлофан и другие упаковочные материалы, разрешенные Министерством здравоохранения. В жестяные банки упаковывают сушеные дрожжи массой нетто 100–2000 г, в пакеты массой нетто 10–2000 г. Банки, коробки и пакеты с дрожжами упаковывают в плотные дощатые ящики, а пакеты массой нетто – 0,01–0,05 кг – в плотные деревянные ящики, выстланные оберточной бумагой. Нефасованные сушеные дрожжи упаковывают в бумажные мешки массой нетто 10–25 кг или в плотные ящики, выстланные внутри пергаментом или под пергаментом мас-

сой нетто 10–20 кг. Для лучшей сохранности нефасованной продукции можно использовать полиэтиленовый мешок, который вкладывается внутрь бумажного мешка.

Сушеные дрожжи хранят в холодильных камерах при температуре не выше 15 °С. Складское помещение должно быть сухим, чистым и вентилируемым. Не допускается совместное хранение сушеных дрожжей с ядовитыми веществами и остро пахнущими продуктами.

Вопросы

1. Как происходит сушка дрожжей в шахтной сушилке?
2. Как происходит сушка дрожжей в виброкипящем слое?
3. Как происходит сушка дрожжей под вакуумом?
4. Как происходит сушка дрожжей методом сублимации?

Тема 13. Кислотность и осмоустойчивость дрожжей

План проведения занятия

13.1. Определение осмоустойчивости дрожжей.

13.2. Определение кислотности дрожжей.

13.1. Определение осмоустойчивости дрожжей

Под осмоустойчивостью понимают способность дрожжей не снижать ферментативную активность в среде с повышенным осмотическим давлением.

Для определения осмоустойчивости на технических весах берут две навески испытуемых дрожжей по 0,31 г каждая. К первой навеске добавляют 4,8 мл водопроводной воды, нагретой до 35 °С, тщательно размешивают с помощью шпателя или пестика в фарфоровой чашке или в ступке, добавляют муку 85%-ного помола от 6,5 до 7,5 г (в зависимости от ее влажности) и быстро замешивают тесто, придавая ему форму шарика, не прилипающего к рукам. Шарик опускают в стакан или цилиндр с водой при температуре 32 °С, засекают время и поддерживают эту температуру до всплывания шарика.

Ко второй навеске добавляют 4,8 мл 3,35%-ного раствора поваренной соли, нагревают до 35 °С и далее поступают так же, как с первой навеской. Время, затраченное на всплывание шариков (в мин.), умножают на коэффициент 3,5 и получают величину подъемной силы, определяемую стандартным способом. Шарик, замешанный на воде без соли, всплывает быстрее. Разница в подъемной силе дрожжей в зависимости от осмотического давления среды, выраженная в минутах, характеризует осмоустойчивость, которую рассматривают как косвенный показатель стойкости дрожжей. Дрожжи с осмоустойчивостью в пределах 10–15 мин стойки при хранении и вполне пригодны для сушки.

13.2. Определение кислотности дрожжей

Навеску дрожжей в 10 г, взвешенную на технических весах, растирают в фарфоровой чашке или стакане с 50 мл дистиллированной

воды и титруют 0,1 н. раствором NaOH в присутствии индикатора фенолфталеина до появления розового окрашивания. Кислотность дрожжей x_2 в пересчете на уксусную кислоту (в мг на 100 г дрожжей), вычисляют по формуле:

$$x_2 = a - b - 100/10,$$

где: a – количество точно 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на нейтрализацию, мл; b – количество уксусной кислоты, соответствующее 1 мл 0,1 н. раствора щелочи, мг.

Вопросы

1. В чем заключается значение осмоустойчивости дрожжей в дрожжевом производстве?
2. Методика определения кислотности дрожжей.

Тема 14. Основные показатели процесса культивирования дрожжей

План проведения занятия

- 14.1. Технологические характеристики установки БИОЛУК-ЗШ.
- 14.2. Принцип действия установки БИОЛУК-ЗШ.
- 14.3. Влияние активной кислотности среды.
- 14.4. Влияние концентрации сухих веществ на рост и развитие дрожжей.
- 14.5. Влияние температуры на процесс культивирования дрожжей.

14.1. Технологические характеристики установки БИОЛУК-ЗШ

Для накопления дрожжевой биомассы надо иметь соответствующую емкость, т.е. аппарат для выращивания товарных кормовых дрожжей, засевные дрожжи чистой культуры, питательную среду и воздух. Каждый из указанных факторов влияет на процесс выращивания дрожжей. После выращивания дрожжи необходимо выделить из отработанной среды, промыть и довести до сухого состояния. Выделяют и обезвоживают дрожжи флотированием, сепарированием, фильтрацией, упариванием и сушкой. Таким образом, технологические операции получения дрожжей разделяются на биохимические, механические и тепловые.

Для культивирования дрожжей используется установка – БИОЛУК-ЗШ (рис. 19) для непрерывного культивирования микроорганизмов при решении биотехнологических задач и проблем, связанных с охраной окружающей среды. Установка может использоваться при процессах переработки субстратов сложного химического состава, для интенсификации микробиологических процессов, а также для ускоренного автоматического отбора активных штаммов, перспективных при использовании в различных областях народного хозяйства и промышленности. Установка – БИОЛУК-ЗШ может использоваться при исследованиях в генетике, биохимии, микробиологии, физиологии и экологии.

Технологические характеристики установки БИОЛУК-ЗШ

Установка может работать с ферментерами объемом	0,1–10 л
Объем культуры в ферментерах	0,05–7 л
Скорость вращения мешалки	до 1500 об/мин
Аэрация	0–2,76 л/мин
Производительность дозатора	20–400 мл/час
Автоматическая стабилизация рН	от 2 до 12
Потребляемая мощность	600 Вт
Напряжение питания	220 В, 50 Гц
Вес	25 кг



Рис. 19. Установка – БИОЛУК-ЗШ

14.2. Принцип действия установки БИОЛУК-ЗШ

Установка работает следующим образом. Питательная среда при помощи перистальтического насоса дозатора по силиконовому шлангу подается в ферментер. Скорость подачи среды в ферментер регулируется в зависимости от цели и задачи исследования, то есть в режиме рН-стата, хемостата. Воздух ферментер поступает от микрокомпрессора через ротаметр, показывающий расход воздуха, воздуш-

ный и водяной фильтр, служащий для стерилизации и увлажнения подаваемого воздуха для насыщения кислородом культуральной жидкости. Перемешивание культуральной жидкости осуществляется вращением мешалки на основе электродвигателя. Регистрация и управление параметров растущей культуры происходит с помощью датчиков рН, рО₂ и др. Выбор датчиков определяется задачей исследования, для стабилизации температуры в ферментере предусмотрено устройство, соединенное с термостатом, для поддержания заданной температуры. Излишки культуральной жидкости из ферментера уносятся воздухом через сливную трубку в бак для урожая.

14.3. Влияние активной кислотности среды

Дрожжи сохраняют жизнеспособность в широких пределах колебания рН – от кислых до щелочных (от 2,5 до 6,5). При выращивании дрожжей оптимальным является рН 4,5–5,5. При этом дрожжевые клетки хорошо растут и быстро размножаются, от условия рН зависит скорость поступления питательных веществ в клетку, активность ферментов, образование витаминов.

В связи с этим, кислотность питательной среды была доведена с рН 3,5 до рН 5,0 раствором NaOH и поддерживалась в пределах оптимальных для дрожжей.

14.4. Влияние концентрации сухих веществ на рост и развитие дрожжей

Осмотическое давление внешней среды должно быть ниже, чем клеточного сока, что способствует усвоению питательных веществ растущей дрожжевой клетки. Чем больше разница в величине осмотического давления в клетке и в среде, тем быстрее накапливается биомасса дрожжей. Количество воды, содержащееся в дрожжевой клетке, может уменьшаться и увеличиваться в зависимости от соотношения концентрации сухих веществ в клеточном соке и окружающем растворе. Количество сухого вещества в клетке будет тем больше, чем выше концентрация сухого вещества в среде.

Концентрация сухих веществ в сусле, полученном нами, составила 10,5 % по сахарометру.

14.5. Влияние температуры на процесс культивирования дрожжей

Оптимальная скорость роста сахаромисетов при температуре 29–30 °С. Скорость роста дрожжей этого рода понижается при температуре 23–27 °С, что видно из сопоставления выхода дрожжей при выращивании их в одних и тех же условиях, но при разной температуре. Повышенная температура 34–40 °С тормозит рост и размножение дрожжей сахаромисетов и не влияет на рост несакхаромисетов. Повышенная температура отрицательно влияет на выход и качество чистых культур сахаромисетов: если при температуре 30 °С выход сахаромисетов составляет 74 %, то при 38 °С он уменьшается до 53 %.

Подъемная сила и бродительная энергия таких дрожжей понижается, в процессе выращивания наблюдается отмирание части дрожжевых клеток. Количество мертвых клеток составляет около 8 %.

При повышении температуры дикие дрожжевые грибы размножаются значительно быстрее сахаромисетов: если при температуре 30 °С коэффициент размножения диких дрожжей в два-три раза больше коэффициента размножения сахаромисетов, то при температуре 38 °С дикие дрожжи размножаются в шесть-восемь раз быстрее сахаромисетов.

В связи с этим, на протяжении всего процесса культивирования, нами поддерживалась температура 30 °С.

Во время культивирования дрожжей нами каждый час определялись следующие показатели: температура, активная кислотность, прирост биомассы и количество дрожжевых клеток в мл. Результаты приведены в таблице 11.

Определение удельной скорости роста дрожжей

Скорость роста дрожжей обусловлена применяемой расой и технологическим режимом и т.д.

Скорость размножения дрожжей можно обозначить коэффициентом скорости образования биомассы M и вычислить по формуле:

$$M = \frac{\ln \cdot m_0}{t},$$

где: m_1 – полученная биомасса в конце процесса; m_0 – начальное количество биомассы; продолжительность процесса выращивания.

Таблица 11 – Основные показатели процесса культивирования дрожжей

Часы культивирования	t°С среды	pH среды	Биомасса, г/л	Дрожжевых клеток, млн./мл
Начальная				
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				

Вопросы

1. Описать технологические характеристики установки БИОЛУК-ЗШ.
2. Описать принцип действия установки БИОЛУК-ЗШ.
3. Как влияет концентрация сухих веществ на рост и развитие дрожжей?
4. Почему важно контролировать температуру культивирования дрожжей?

Тема 15. Анализ готовой продукции

План проведения занятия

- 15.1. Правила приемки дрожжей.
- 15.2. Отбор проб и определение влажности дрожжей.

15.1. Правила приемки дрожжей

Дрожжи принимают партиями. Партией считается любое количество дрожжей одной даты выработки, сопровождаемое одним документом о качестве с указанием: наименования предприятия-изготовителя и его местонахождения, товарного знака, наименования продукции, массы нетто, даты выработки, обозначения настоящего стандарта, подъемной силы, кислотности, влажности, гарантийного срока хранения.

Для контроля качества продукции от партии отбирают выборку. При наличии в партии до четырех ящиков проверке подвергают все ящики, если в партии более четырех ящиков, то отбирают 5 % ящиков, но не менее четырех и не более 20. При получении неудовлетворительных результатов анализов хотя бы по одному из показателей проводят повторные анализы удвоенной выборки при выборочном контроле и удвоенной пробы при сплошном контроле. Результаты повторных анализов распространяются на всю партию.

5.2. Отбор проб и определение влажности дрожжей

Для определения влажности, подъемной силы, кислотности дрожжей из каждого ящика, отобранного по правилам приемки, берут точечные пробы массой не менее 40 г и смешивают их для получения объединенной пробы массой не менее 300 г. Объединенную пробу сокращают до средней пробы массой 200 г.

Среднюю пробу делят на две равные части. Одна часть предназначена для проведения анализов, а другую помещают в чистую коробочку с отверстиями и хранят на предприятии-изготовителе в течение суток при температуре от 0 до плюс 4 °С и в случае возникновения разногласий отправляют в нейтральную лабораторию. Коро-

бочка должна быть снабжена ярлыком с указанием номера и массы партии, даты выработки дрожжей и взятия пробы, фамилий лиц, отбиравших пробы и их подписей.

Подготовка к анализу. Приготовленные металлические или стеклянные бюксы помещают в сушильный шкаф, предварительно нагретый до 105 °С, просушивают и тарируют. Если бюксы металлические, крышки подкладывают под дно, если бюксы стеклянные, крышки помещают рядом.

Проведение анализа. Часть средней пробы (не менее 10 г) измельчают ножом или сеткой, отбирают две навески по 1,5 г каждая в заранее просушенные и протарированные металлические или стеклянные бюксы.

Высушивание проводят в сушильном шкафу при 105 °С до постоянной массы. В процессе сушки в сушильных шкафах допускается отклонение от установленной температуры не более 2 °С.

Первое взвешивание проводят через 4 ч после начала высушивания, последующие – через 1 ч. Перед каждым взвешиванием бюксы закрывают крышками и переносят в эксикатор для охлаждения не менее чем на 20 мин и не более чем на 2 ч.

Постоянной считают массу, если разница между двумя взвешиваниями не превышает 0,001 г.

Обработка результатов. Массовую долю влаги X вычисляют по формуле:

$$X = (m - m_1) \cdot 100 / (m - m_2),$$

где: X – массовая доля влаги, %; m – масса навески с бюксой до высушивания, г; m₁ – масса навески с бюксой после высушивания, г; m₂ – масса бюксы, г; 100 – переводной коэффициент, %.

За окончательный результат анализа принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми в одной лаборатории не должны превышать 0,5 %, в разных лабораториях – 1 %.

Определение влажности (ускоренный метод). Метод предназначен для определения влажности ускоренным способом с помощью прибора марки ВЧМ (влагомер Чижовой модернизированный) для внутрипроизводственного контроля.

Проведение анализа. Прибор включают и нагревают до температуры 160 °С. Из листа газетной или ротаторной бумаги размером 20×15 см готовят пакет, складывают его вдвое и загибают края.

Два таких пакета кладут рядом на плиту прибора (так, чтобы один пакет не находил на другой), накрывают второй плитой, следя за тем, чтобы зазор между плитами был всюду одинаковым, и сушат в течение 3 мин при 160 °С. Затем пакеты помещают в эксикатор на 2–3 мин для охлаждения. После этого их взвешивают и на краю пакета записывают его массу.

Часть средней пробы (не менее 20 г) протирают через сетку с отверстиями диаметром 2–3 мм и от нее отбирают в каждый пакет навеску массой 5 г, закрывают их и на краю пакета записывают массу пакета с навеской.

Дрожжи в пакете осторожно встряхивают, чтобы они равномерно распределились по всей внутренней поверхности пакета. Если дрожжи влажные и легко склеиваются в комочки, то навеску дрожжей надо распределить по пакету шпателем.

Пакеты с дрожжами высушивают при температуре 160–162 °С в течение 7 мин. После этого пакеты помещают на 2–3 мин в эксикатор для охлаждения, затем взвешивают и записывают массу на том же пакете.

Обработка результатов. Массовую долю влаги X вычисляют по формуле:

$$X = (m_3 - m_5) \cdot 100 / (m_3 - m_4),$$

где: X – массовая доля влаги, %; m₃ – масса пакета с навеской до высушивания, г; m₄ – масса пустого пакета, г; m₅ – масса пакета с навеской после высушивания, г.

Вычисление проводят с точностью до целого числа.

Вопросы

1. Перечислите правила приемки дрожжевой продукции.
2. Как проводят отбор проб и определение влажности дрожжей?

Тема 16. Количественный учет дрожжей

План проведения занятия

- 16.1. Методы количественного учета дрожжей.
- 16.2. Подсчет клеток в счетных камерах.
- 16.3. Комплексный подсчет клеток в счетных камерах.
- 16.4. Подсчет клеток в фиксированных окрашенных препаратах (метод Виноградского-Брида).
- 16.5. Методы высева на питательные среды.
- 16.6. Определение биомассы взвешиванием.

16.1. Методы количественного учета дрожжей

О росте микроорганизмов в естественных субстратах или в питательных средах судят по изменению количества их клеток или биомассы в единице объема. Методы определения этих показателей могут быть прямыми (подсчет клеток под микроскопом, взвешивание) или косвенными. Косвенные методы основаны на измерении параметров, величина которых зависит от количества или биомассы микроорганизмов (число колоний, выросших после посева суспензии клеток на питательную среду, рассеяние или поглощение суспензией света, содержание в ней белка и т.д.). Выбор метода зависит от целей исследования, свойств питательной среды или субстрата, а также особенностей роста и морфологии микроорганизмов.

При оценке численности микроорганизмов, особенно в естественных субстратах, необходимо помнить, что их клетки часто находятся в прикрепленном (адгезированном) состоянии или в виде микроколоний. Поэтому перед началом подсчета их нужно отделить от частиц субстрата и друг от друга (десорбировать). Выбор метода десорбции (механическое перемешивание суспензии клеток, растирание, обработка ультразвуком, применение поверхностно-активных веществ и т.д.) определяется особенностями исследуемого субстрата.

Для подсчета клеток микроорганизмов под микроскопом можно использовать счетные камеры, препараты фиксированных и окрашенных клеток, приготовленные на предметных стеклах или мембран-

ных фильтрах. Перечисленные методы позволяют определить общее количество клеток (как живых, так и мертвых) в единице объема. Основное ограничение большинства указанных методов – необходимость довольно высоких концентраций клеток в единице исследуемого субстрата.

В отличие от подсчета микроорганизмов под микроскопом метод высева на питательные среды дает возможность определить только число жизнеспособных клеток в популяции.

Поскольку сред, пригодных для роста всех микроорганизмов, не существует, метод высева позволяет определить лишь число микроорганизмов, способных расти на среде данного состава. Это важно помнить при анализе таких естественных субстратов, как почва, вода и т.п.

Метод взвешивания биомассы широко применяют для оценки роста микроорганизмов в жидких питательных средах. Можно использовать его и для определения массы клеток, выращенных на плотной питательной среде, однако в этом случае микроорганизмы необходимо предварительно тщательно смыть с поверхности среды физиологическим раствором или водой и перевести в суспензию.

Оптический (нефелометрический, турбидиметрический) метод определения биомассы нашел широкое применение в лабораторных микробиологических исследованиях, поскольку позволяет быстро и довольно точно определить концентрацию клеток в суспензии или культуральной жидкости. В основе метода лежит измерение ослабления светового пучка при его прохождении через суспензию клеток. В определенных пределах оно обусловлено преимущественно рассеиванием света клетками пропорционально их концентрации. Величина этого показателя зависит от многих факторов (формы и размеров клеток, оптических свойств культуральной среды, длины волны света и т.д.), поэтому нефелометрический метод пригоден лишь для тех микроорганизмов, рост которых вызывает равномерное помутнение среды и не сопровождается заметным изменением формы и размеров клеток, образованием мицелия, пленок или других скоплений.

Точность любого метода определения числа микроорганизмов ограничена ошибкой метода, которая возникает вследствие случайного распределения клеток в суспензии и является результатом ограниченного числа подсчитываемых клеток, а также связана с техническими ошибками, т.е. неточностью в приготовлении разведений, неправильным монтажом камеры, повторным учетом одной и той

же клетки (колонии) и т.д. Ошибки метода неизбежны, тогда как технические ошибки зависят главным образом от качества работы исследователя. Следует помнить, что статистическая обработка результатов возможна только при минимальной технической ошибке.

Чашечный метод требует особой чистоты и аккуратности при выполнении всех операций. Необходимо тщательно оберегать пипетки, пробирки и среды от заражения микроорганизмами из воздуха, так как каждая случайно попавшая клетка может заметно завысить число микроорганизмов в исследуемом субстрате.

16.2. Подсчет клеток в счетных камерах

Это метод рекомендуется использовать для подсчета крупных объектов – дрожжей, одноклеточных водорослей, конидий грибов, некоторых относительно крупных бактерий. Наиболее распространенной является камера Горяева–Тома (рис. 20). Внешне она представляет собой толстое предметное стекло, разделенное бороздками. Центральная часть стекла содержит выемку глубиной 0,1 мм, на дно которой нанесена сетка. Глубина камеры 0,1 мм, площадь больших квадратов сетки – 1/25 мм², площадь малых квадратов – 1/400 мм². Эти параметры указаны на предметном стекле.

При работе с камерой необходимо соблюдать определенные правила ее заполнения. Углубление с сеткой покрывают специальным шлифованным покровным стеклом и, слегка прижимая, двигают покровное стекло в противоположные стороны до появления картины интерференции (колец Ньютона), свидетельствующей о том, что стекло притерто к сторонам камеры. Только при таком условии объем камеры соответствует расчетному. После этого под кромку покровного стекла в центральной части камеры капилляром или пипеткой вносят суспензию исследуемых дрожжей. Заполненную камеру помещают на столик микроскопа. Подсчет клеток рекомендуется начинать через 2–3 минуты после заполнения камеры, чтобы клетки осели, и при микроскопировании находились в одной плоскости.

Число клеток подсчитывают с объективом 40^x. С иммерсионным объективом работать нельзя, так как его рабочее расстояние меньше толщины стекла камеры.

Обычно просчитывают клетки микроорганизмов в 10 больших или 20 малых квадратах сетки, следуя по диагонали. Учитывают все

клетки, лежащие в квадрате сетки, а также пересекающие верхнюю и правую стороны квадрата. При подсчете число клеток в большом квадрате не должно превышать 20, а в малом – 10, в противном случае исходную суспензию разводят водопроводной водой. Для получения достоверного результата общее число подсчитанных клеток микроорганизмов должно быть не менее 600.

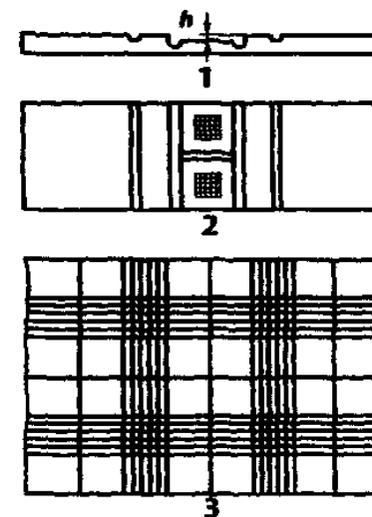


Рис. 20. Счетная камера Горяева-Тома:

1 – вид сбоку; 2 – вид сверху; 3 – при малом увеличении микроскопа; h – глубина камеры.

Подсчет клеток повторяют 3–5 раз, каждый раз заново монтируя камеру и заполняя ее суспензией микроорганизмов. Это обеспечивает большую точность, чем подсчет 600 клеток при однократном монтаже камеры. Количество клеток в 1 см³ исследуемой суспензии вычисляют по формуле:

$$M = \frac{a \cdot 1000}{h \cdot S} \cdot n,$$

где: M – количество клеток в 1 см³ суспензии; a – среднее количество клеток в квадрате сетки; h – высота камеры, мм; S – площадь квадрата сетки, мм²; 1000 – коэффициент перевода см³ в мм³; n – степень разведения исследуемой суспензии.

16.3. Комплексный подсчет клеток в счетных камерах

При соблюдении всех правил работы со счетными камерами можно объединить в одном стекле несколько тестов. Это позволит существенно сэкономить время.

В пробирку внести 0,5–1,0 см³ дрожжевой взвеси и такое же количество раствора метиленового синего 1: 40. Окрашенную суспензию выдержать 3–4 минуты, тщательно перемешать и заправить ею счетную камеру. При работе с камерой необходимо соблюдать правила ее заполнения и счета, описанные выше. Число клеток подсчитывают с объективом 40 \times .

В приготовленной таким образом дрожжевой взвеси можно одновременно считать общее количество клеток, количество почкующихся клеток и мертвых почек, количество мертвых клеток в 1 см³ питательного субстрата.

Поскольку жидкость под покровным стеклом быстро высыхает, необходимо быстрое проведение и фиксирование результатов подсчета. Замедлить высыхание можно добавлением в окрашенную взвесь такого же количества 0,05 %-ого водного раствора агара, что необходимо учесть в показателе n – степень разведения. В таком препарате возможно произвести и измерение размеров клеток. С этой целью лучше использовать капилляры Перфильева, применяя соответствующие правила подсчета.

Количество клеток в 1 см исследуемой суспензии вычисляют по формуле:

$$M = \frac{a \cdot 1000}{h \cdot S} \cdot n \cdot 2,$$

где: M – количество клеток в 1 см³ суспензии; a – среднее количество клеток в квадрате сетки; h – высота камеры, мм; S – площадь квадрата сетки, мм²; 1000 – коэффициент перевода см³ в мм³; n – степень разведения исследуемой суспензии; 2 – разведение раствором синьки.

Результаты счета можно фиксировать в предлагаемой в качестве примера таблице 12.

Таблица 12 – Характеристика клеток дрожжевой взвеси

Время брожения (часы/сутки)	Общее кол-во клеток (млн./мл)	Кол-во почкующихся клеток (млн./мл)	Кол-во мертвых клеток (млн./мл)	% почкующихся клеток	% мертвых клеток	Средний размер клеток

16.4. Подсчет клеток в фиксированных окрашенных препаратах (метод Виноградского-Брида)

Этот метод применяется в различных модификациях для определения численности микроорганизмов в разнообразных естественных субстратах – почве, загрязненной воде, оптически непрозрачных средах, содержащих нерастворимые в воде компоненты, например, крахмал, муку и т.д. Преимущество метода заключается еще и в том, что фиксированные окрашенные препараты могут долго храниться, поэтому подсчет можно производить в удобное для исследователя время.

Хорошо обезжиренное предметное стекло помещают на миллиметровую бумагу, на которой размечен прямоугольник площадью 4 или 6 см². Затем на стекло наносят точно отмеренный объем исследуемой суспензии (10; 20 или 30 мкл). В некоторых случаях добавляют каплю 0,03–0,1 %-го водного раствора агара. Нанесенную суспензию равномерно распределяют петлей по площади, отмеченной на миллиметровой бумаге. Препарат подсушивают на воздухе, фиксируют 10–20 мин абсолютным спиртом (96°) и окрашивают эритрозин, метиленовым синим, фуксином или другим красителем. Затем препарат промывают, последовательно погружая стекло в 4–5 сосудов с водой (промывать под проточной водой не следует) и высушивают на воздухе. В таком виде препараты хорошо сохраняются.

Препарат микроскопируют с иммерсионным объективом. При этом подсчитывают количество клеток в квадратах окулярной сетки, которую помещают в окуляр между собирающей и глазной линзами.

При отсутствии сетки подсчитывают число клеток в поле зрения микроскопа. Правило подсчета в квадратах окулярной сетки то же, что и в квадратах сетки счетной камеры. Чтобы результат был достоверным, клетки микроорганизмов рекомендуется подсчитывать в 50–100 полях зрения. Общее количество подсчитанных клеток не должно быть менее 600. Количество клеток микроорганизмов в 1 см³ исследуемого субстрата вычисляют по формуле:

$$M = \frac{a \cdot S}{s \cdot V} \cdot n,$$

где: M – количество клеток в 1 см³ суспензии; a – среднее количество клеток в квадрате окулярной сетки (поле зрения); S – площадь мазка, мм²; s – площадь квадрата окулярной сетки (поля зрения), мм²; V – объем нанесенной на стекло суспензии, см³; n – степень разведения исследуемой суспензии.

Площадь квадрата сетки, или поля зрения, определяют с помощью объект-микрометра, который помещают на столик микроскопа вместо препарата, и при том же увеличении, при котором проводили подсчет, определяют сторону квадрата окулярной сетки или диаметр поля зрения. Площадь поля зрения вычисляют по формуле:

$$S = \Pi r^2.$$

16.5. Методы высева на питательные среды

Определение количества клеток высевом на плотные питательные среды (метод Коха). Метод широко применяют для определения численности жизнеспособных клеток в различных естественных субстратах и в лабораторных культурах. В его основе лежит принцип Коха, согласно которому каждая колония является потомством одной клетки. Это позволяет на основании числа колоний, выросших после посева на плотную питательную среду определенного объема исследуемой суспензии, судить об исходном содержании в ней клеток микроорганизмов. Результаты количественного определения микроорганизмов, проведенного по методу Коха, часто выражают не в числе клеток, а в условных, так называемых колониобразующих единицах – КОЕ.

Определение числа микроорганизмов этим методом включает три этапа: приготовление разведений, посев на плотную среду в чашки Петри и подсчет выросших колоний.

Приготовление разведений. Численность популяции микроорганизмов обычно велика, поэтому для получения изолированных колоний необходимо приготовить ряд последовательных разведений. Разведения готовят в стерильной водопроводной воде или в 0,85 %-ом растворе NaCl (физиологическом растворе). В ходе опыта целесообразно использовать один и тот же коэффициент разведения, например, 10, что уменьшает вероятность ошибки.

Для приготовления разведений стерильную водопроводную воду разливают по 9 см³ в стерильные сухие пробирки. Затем 1 см³ исследуемой суспензии стерильной пипеткой переносят в пробирку с 9 см³ стерильной воды – это первое разведение (10⁻¹). Полученное разведение тщательно перемешивают новой стерильной пипеткой, несколько раз вбирая в пипетку и выпуская из нее полученную суспензию клеток. Затем той же пипеткой отбирают 1 см³ суспензии и переносят во вторую пробирку, получая второе разведение (10⁻²). Таким же образом готовят последующие разведения. Степень разведения зависит от плотности исследуемой популяции микроорганизмов (см. рис. 21).

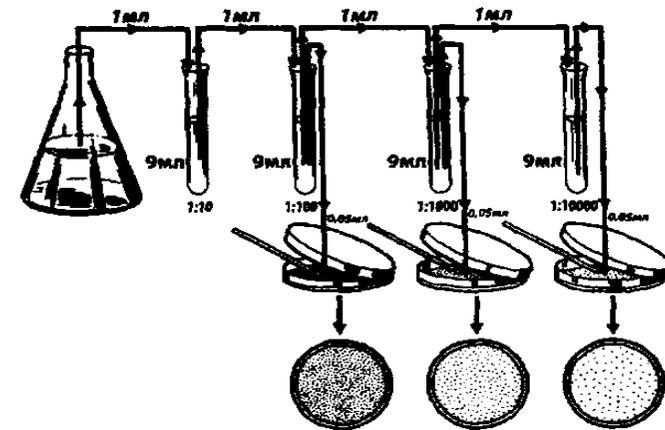


Рис. 21. Схема приготовления разведений и посева суспензии микроорганизмов

Для приготовления каждого разведения следует обязательно использовать новую пипетку. Пренебрежение этим правилом приводит к получению ошибочного результата вследствие высокой способности клеток микроорганизмов к сорбции на поверхности стекла.

Посев. Высевать суспензию можно поверхностным или глубинным способом. Перед посевом поверхностным способом разливают агаризованную питательную среду в ряд стерильных чашек Петри по 15–20 см в каждую. Чашки оставляют на горизонтальной поверхности, пока среда не застынет. Поверхность агаризованных сред перед посевом рекомендуется подсушить для удаления конденсационной влаги в стерильном боксе или поместив их в термостат на 2–3 суток крышками вниз.

В чашку Петри с подсушенной средой вносят точно измеренный объем (0,05 или 0,1 см³) соответствующего разведения и распределяют его стеклянным шпателем по поверхности среды. Высевы на плотную среду проводят, как правило, из трех последних разведений, причем из каждого делают 2–4 параллельных посева. Посевы можно делать одной пипеткой, при этом начинать следует обязательно с большего разведения. Для каждого разведения используют новый стерильный шпатель. После посева чашки Петри помещают в термостат крышками вниз.

При глубинном посеве точно измеренный объем (как правило, 0,1; 0,5 или 1,0 см³) исходной суспензии или разведения вносят в расплавленную и остуженную до 45–50°C среду, тщательно перемешивают, затем немедленно выливают в чашку Петри и дают среде застыть. В случае глубинного посева пользуются средой, предварительно разлитой и проавтоклавированной в пробирках.

При больших масштабах работы среду по пробиркам не разливают, а поступают следующим образом. По 1 см из соответствующего разведения переносят стерильной пипеткой в 2–4 стерильные чашки Петри. Затем заливают в чашки по 15–20 см³ среды, расплавленной и остуженной до 45–50°C, и смешивают питательную среду с посевным материалом легким вращательным движением чашки по поверхности стола, после чего чашки оставляют на горизонтальной поверхности до застывания среды. Когда среда застынет, чашки Петри в перевернутом виде помещают в термостат.

Работа с дрожжами не позволяет использовать метод глубинного посева ввиду интенсивного газообразования и разрыва питательной среды. Однако, используя соответствующие ингибиторы дрожжевого роста, для определения степени инфицирования сопутствующей бактериальной микрофлорой данный метод вполне эффективен.

Для определения количества клеток анаэробных микроорганиз-

мов чашки Петри после посева помещают в анаэроостат. Иногда для определения численности анаэробов плотную среду после засева оставляют в пробирках. Поверхность застывшей среды заливают парафином. Для лучшего учета колоний микроорганизмов среды в этом случае рекомендуется осветлять.

Подсчет выросших колоний. Колонии микроорганизмов, в зависимости от скорости роста, подсчитывают через 1–15 суток инкубации. Подсчет, как правило, проводят, не открывая чашек Петри. Для удобства каждую просчитанную колонию отмечают точкой на наружной стороне дна чашки. При большом количестве колоний дно чашки Петри делят на секторы, просчитывают колонии в каждом секторе и суммируют результаты. Иногда для подсчета колоний используют специальные полуавтоматические счетчики.

Лучшим разведением следует считать то, из которого при высеве в чашку Петри вырастает от 30–50 до 100–150 колоний. Если число выросших колоний меньше 10, то эти результаты для расчета количества клеток в исходном материале не используют. Результаты параллельных посевов из одного и того же разведения суммируют и определяют среднее число колоний на одной чашке.

Количество клеток в 1 мл исследуемого субстрата вычисляют по формуле:

$$M = \frac{a \cdot 10^n}{V},$$

где: М – количество клеток в 1 см³ исследуемого субстрата; а – среднее число колоний, выросших после посева из данного разведения; V – объем суспензии, взятый для посева см³; 10ⁿ – степень разведения.

Упрощенный количественный учет дрожжей. Дрожжевые колонии в посевах учитывают следующим образом. Обратную сторону каждой чашки разделяют чернилами или тушью на большее или меньшее число частей – от четырех до шестнадцати, в зависимости от густоты посева, и просматривают все колонии на каждой ограниченной площади с объективом 10^x в просвечивающем микроскопе или с бинокулярной лупой в отраженном свете. Описывают все встречающиеся типы колоний в стандартных терминах. Из них готовят препараты и микроскопируют при больших увеличениях. Этот детальный просмотр колоний при первом посеве очень важен, так как при последующих пересевах некоторые признаки, например, спорообразование, иногда исчезают. Рекомендуется сразу же делать фо-

тографии или зарисовки. Колонии разных типов нумеруют и просчитывают отдельно.

Учет производят дважды. В первый срок отмечают с обратной стороны чашки все выросшие и просчитанные колонии, а затем оставляют чашки еще на несколько дней для наблюдения за возможным появлением колоний медленно растущих дрожжей.

При необходимости количественного учета расчет численности дрожжей в единице массы или объема исследуемого материала ведут по формуле:

$$n = a \cdot b \cdot v,$$

где: a – среднее число колоний на одной чашке Петри; b – число капель в 1 см^3 суспензии данного разведения; v – степень разбавления образца.

Отдельные изоляты (штаммы) получают путем пересева изолированных колоний в пробирки на те же среды, на которые производили первичный высев.

16.6. Определение биомассы взвешиванием

Определение биомассы состоит из трех последовательных операций:

- доведение массы центрифужных пробирок или фильтров до постоянного значения;
- отделение клеток микроорганизмов от культуральной жидкости;
- определение их массы. Чаще всего определяют массу сухих клеток, хотя иногда можно ограничиться определением сырой биомассы. В последнем случае первый этап отпадает; достаточно только взвесить пустую центрифужную пробирку (фильтр), но не доводить ее массу до постоянного значения. Биомассу обычно выражают в граммах или миллиграммах на литр культуральной жидкости.

Вопросы

1. Перечислить методы количественного учета дрожжей.
2. Опишите метод подсчета клеток в счетных камерах.
3. Какие характерные особенности у комплексного подсчета клеток в счетных камерах?
4. Для каких объектов применяют подсчет клеток в фиксированных окрашенных препаратах?
5. Перечислите методы подсчета дрожжевых клеток на плотных питательных средах.
6. Назовите основные этапы определения биомассы взвешиванием.

Тема 17. Расчет основных технологических показателей

План проведения занятия

- 17.1. Расчет материального баланса.
- 17.2. Материальный баланс.
- 17.3. Рекомендации по выполнению расчета основных технологических показателей.

17.1. Расчет материального баланса

Эффективность процесса культивирования определяется выходом биомассы с единицы полезной емкости дрожжерастильного аппарата. Выход биомассы – так называемый экономический коэффициент – представляет собой отношение количества синтезированной абсолютно сухой биомассы к потребленным питательным веществам среды. Экономический коэффициент может быть определен по формуле:

$$Y = x / (S_0 - S_1),$$

где: x – концентрация дрожжей в среде, г/л; S_0 – концентрация питательных веществ в исходной среде; S_1 – концентрация питательных веществ на выходе из аппарата.

Дрожжи рода *Candida* относятся к небродящим дрожжам. В связи с этим, основное количество источников углерода среды расходуется на образование биомассы, что и обеспечивает высокий экономический коэффициент – до 50%. Максимальный выход дрожжей возможен лишь в том случае, если средняя длительность t пребывания среды и дрожжевых клеток в аппарате равна генерационному периоду g , т.е. когда справедливо равенство:

$$\tau = g = 1/\mu.$$

Если $\tau < g$, концентрация клеток в среде уменьшается.

Если $\tau > g$, выход биомассы снижается, так как увеличивается время пребывания среды в аппарате.

При непрерывном культивировании производительность Q аппарата определяется как произведение скорости разбавления D на концентрацию биомассы x в среде.

$$\begin{aligned} \text{Но поскольку} \quad & x = (S_0 - S)Y \quad \text{или} \quad x = S_1 Y, \\ \text{то} \quad & Q = DS_1 Y \quad [\text{кг}/(\text{м}^3 \cdot \text{ч})]. \end{aligned}$$

Для получения оптимального выхода дрожжей и обеспечения необходимой производительности аппарата необходимо подобрать такие условия процесса выращивания, при которых скорость протока соответствовала бы скорости роста дрожжей и ассимиляции ими питательных веществ среды. Иными словами, важно правильно определить длительность t пребывания в аппарате среды и дрожжевых клеток. T (оборот аппарата) является величиной, обратной D , а следовательно, и μ .

$$T = 1/\mu = 1/D.$$

Если дрожжевые клетки равномерно распределены и концентрация их в аппарате и на выходе одинакова, то продолжительность пребывания дрожжей в аппарате равна пребыванию в нем среды.

Непрерывное культивирование кормовых дрожжей может осуществляться по различным технологическим схемам. При выращивании дрожжей в одночленной батарее в аппарат непрерывно подаются основное углеродсодержащее сырье, питательные соли и отводится дрожжевая суспензия. Отбор дрожжей полностью компенсируется их приростом. Это достигается при условии, что удельная скорость роста дрожжей μ равна скорости разбавления среды. Максимальная утилизация питательных веществ среды происходит в одном аппарате. По этой технологической схеме работают многие заводы в нашей стране и за рубежом.

17.2. Материальный баланс

Процесс ферментации можно оценивать по различным показателям, используя расчетные формулы.

1. Продуктивность по биомассе Q_x , г/л ч;

а) для периодического процесса

$$Q_x = \frac{X_1 - X_0}{t_1 - t_0};$$

б) для непрерывного процесса

$$Q_x = D \cdot X_1,$$

где: X_0 – концентрация биомассы, г/л на период времени, t_1 ч; X_1 – концентрация биомассы (г/л) на период времени, t_1 /ч; D – коэффициент разбавления или скорости потока, 1/ч, равный удельной скорости (μ) для непрерывного процесса.

2. Удельная скорость роста, μ , л/ч.

3. Концентрация биомассы

$$\mu = \frac{X_1 - X_0}{X_0 \cdot (t_1 - t_2)}.$$

Для Log – фазы размножения $e = 2,718$.

4. Продуктивность по целевому продукту, Q_p , г/л·ч:

а) для периодического процесса

$$Q_p = \frac{P_1 - P_0}{t_1 - t_0};$$

б) для непрерывного процесса

$$Q_p = D \cdot P,$$

где: P – концентрация продукта, г/л ч.

5. Удельная скорость образования целевого продукта, q_p , г/г·ч

$$q_p = \frac{P_1 - P_0}{X_1(t_1 - t_0)}.$$

6. Удельная скорость потребления субстрата, q_s , г/г·ч

$$q_s = \frac{S_0 - S_1}{X_1(t_1 - t_0)},$$

где: S – концентрация субстрата, г/л.

7. Выход биомассы из субстрата или экономический коэффициент, $Y_{x/s}$, г/г

$$Y_{x/s} = \frac{M}{q_s} = \frac{X_1 - X_0}{S_0 - S_1}.$$

8. Выход целевого продукта, $Y_{p/s}$, г/г,

$$Y_{p/s} = \frac{q_p}{q_s} = \frac{P_1 - P_0}{S_0 - S_1}.$$

Общая продуктивность (P_{ap}) в биореакторе определяется количеством целевого продукта в ED активности или в кг получаемого продукта с 1 м³ ферментационной емкости в час.

Расчет

Периодический процесс Непрерывный процесс

$$P_{ap} = \frac{V_{of} \cdot A_{of} \cdot 10^6}{V_f \cdot T_c}, \text{ ED/м}^3, \text{ ч}, \quad P_{ap} = \frac{W_{of} \cdot A_{of} \cdot 10^6}{V_f}, \text{ ED/м}^3, \text{ ч},$$

$$P_{ap} = \frac{V_{of} \cdot C}{V_f \cdot T_c}, \text{ кг/м}^3, \text{ ч}, \quad P_{ap} = \frac{W_{of} \cdot C}{V_f}, \text{ кг/м}^3, \text{ ч},$$

где: V_{of} – объем культуральной жидкости за весь процесс ферментации, м^3 ; A_{of} – активность культуральной жидкости, ED/м^3 ; C – концентрация целевого продукта в культуральной жидкости, кг/м^3 ; W_{of} – скорость слива культуральной жидкости из ферментатора, $\text{м}^3/\text{ч}$; V_f – вместимость ферментатора, м^3 ; T_c – время цикла работы ферментатора, ч.

Общую продуктивность для непрерывных процессов определяют в установившемся режиме, а для периодических процессов и полунепрерывных – с учетом времени на подготовку ферментатора к работе.

Объемная продуктивность процесса (P_{cp}) – это количество целевого продукта в ED активности или в кг, получаемого с 1 м^3 питательной среды в час.

Расчет

Периодический процесс Непрерывный процесс

$$P_{ap} = \frac{V_{of} \cdot A_{of} \cdot 10^6}{V_{nm} \cdot T_c}, \text{ ED/м}^3, \text{ ч}, \quad P_{ap} = \frac{W_{of} \cdot A_{of} \cdot 10^6}{V_{nm}}, \text{ ED/м}^3, \text{ ч},$$

$$P_{ap} = \frac{V_{of} \cdot C}{V_{nm} \cdot T_c}, \text{ кг/м}^3, \text{ ч}, \quad P_{ap} = \frac{W_{of} \cdot C}{V_{nm}}, \text{ кг/м}^3, \text{ ч},$$

V_{nm} – объем питательной среды, м^3 .

Выход продукта от субстрата (L_s) – это количество целевого продукта в ED активности или кг, полученное из 1 кг компонента ферментационной среды, являющегося энергоносителем.

Расчет

Периодический процесс Непрерывный процесс

$$L_s = \frac{V_{of} \cdot A_{of} \cdot 10^6}{m_s}, \text{ ED/м}^3, \text{ ч}, \quad L_s = \frac{A_{of} \cdot 10^6}{S_0}, \text{ ED/м}^3, \text{ ч},$$

$$L_s = \frac{V_{of} \cdot C}{m_s}, \text{ кг/м}^3, \text{ ч}, \quad L_s = \frac{W_{of} \cdot C}{S_0}, \text{ кг/м}^3, \text{ ч},$$

где m_s – исходное содержание энергоносителя в субстрате, кг; S_0 – исходная концентрация энергоносителя в субстрате, кг/м^3 .

Степень использования субстрата (U)

$$U = \frac{S_0 - S_k}{S_0},$$

где S_0 – исходная концентрация энергоносителя в субстрате; S_k – конечная концентрация энергоемкого компонента в субстрате.

17.3. Рекомендации по выполнению расчета основных технологических показателей

Исходные данные для расчета основных технологических показателей процесса ферментации приведены в таблице 13.

Таблица 13 – Исходные данные для расчета основных

№ вар.	Объем фермента тора (геом.), м^3	Объем фермента тора (рабочий), $\text{м}^3 (V_f)$	Время цикла работы фермента тора, ч(t)	Концентрация биомассы, г/л (X)	Концентрация продукта в культуральной жидкости, г/л (C)	Скорость слива культуральной жидкости, $\text{м}^3/\text{ч}$ (W_{ct})
1	10	8	24-30	3,5-4,0	1,4	0,15
2	16	11,2	20-40	10,1	11,5	0,16
3	20	16	30-36	9,6	22	0,2
4	32	26	36-42	8,5	32	0,25
5	50	20	46-48	15	44	0,30
6	63	50,4	44-48	20	49	0,40
7	100	70	48-52	16,6	57	0,5
8	160	128	36-48	20	65	0,1
9	200	160	36-72	50	5,0	0,35
10	800	320	7-8	35	2,0	0,6

Тема 18. Санитарная обработка оборудования на предприятиях дрожжевого производства

План проведения занятия

- 18.1. Санитарная обработка при производстве хлебопекарных дрожжей.
- 18.2. Дезинфекция оборудования для производства кормовых дрожжей.

18.1. Санитарная обработка при производстве хлебопекарных дрожжей

Резервуары для хранения мелассы по мере опорожнения подвергаются очистке, тщательной отмывке от остатков мелассы и дезинфекции 3%-ным раствором хлорной извести с последующей промывкой.

Все продуктовые коммуникации промываются водой до получения чистой промывной воды, после этого заполняются дезинфицирующим раствором, промываются водой и пропариваются.

Оборудование и инвентарь завода должны быть исправными и содержаться в чистоте.

Станины машин, а также наружные стенки аппаратов и трубопроводов протирают чистыми тряпками, а медные части начищают до блеска.

Все технологические емкости – рассиропники мелассы, приточные чаны, мерники, дрожжерастильные аппараты, сборники дрожжевого молока – после каждого цикла тщательно промываются моющими средствами, ополаскиваются водой и сдаются лаборатории с пробой «на мазок». В просматриваемых под микроскопом пробах промывной воды и смывов со стенок, змеевиков и воздухораспределительных систем не должно быть живых бактерий и дрожжей.

После проверки аппараты должны пропариваться не менее часа до так называемой пробы «на утюг». Коммуникации промываются, как указано выше, и пропариваются.

Классификаторы после каждого цикла разбирают, освобождают от осадка, тщательно моют и дезинфицируют.

Сепараторы разбирают, моют и дезинфицируют не реже одного раза в сутки. Мойку проводят немедленно после окончания сепарирования. Тарелки сепаратора протирают щетками и ополаскивают каждую отдельно, затем заливают 5%-ным раствором кальцинированной соды, выдерживают 30–40 мин и прополаскивают водой. Мундштуки промывают специальными шприцами. Станину, отводные рукава и прилегающие участки трубопроводов тщательно промывают, дезинфицируют.

Фильтр-прессы ежедневно промывают холодной, затем горячей водой. Рамы и плиты протирают щетками и тщательно прополаскивают. Собирают пресс после приемки его лабораторией завода.

Вакуум-фильтры, сборники и коммуникации моют при остановке фильтра. Вначале все ополаскивается холодной водой, затем тщательно промывается 1%-ным раствором каустической соды, приготовленной в сборнике дрожжевого молока.

Фильтрующие салфетки к фильтр-прессам и полотна к вакуум-фильтрам тщательно отмывают холодной водой от остатков дрожжей и подвергают мойке в стиральных машинах. Порядок мойки оговорен инструкциями по эксплуатации данной машины. По окончании цикла мойки полотна в машине тщательно пропариваются.

При отсутствии стиральной машины ткань выдерживают 2–3 ч в 0,1%-ном холодном растворе каустической соды, затем тщательно отмывают холодной водой и кипятят в специальном бачке в течение часа.

Промытую ткань высушивают и подвергают ремонту или отбраковке. К дальнейшему использованию непригодны полотна, имеющие самые незначительные прорывы.

Генеральная мойка дрожжерастильных аппаратов с трубчатой воздухораспределительной системой. Помимо описанной выше периодической мойки оборудования на заводах хлебопекарных дрожжей не реже 1 раза в месяц проводят так называемую генеральную мойку с остановкой завода на 5 рабочих смен. Мойку начинают с производственных мелассных резервуаров. В них после тщательной мойки готовят растворы антиформина. По мере опорожнения последующая аппаратура подвергается тщательной мойке, одновременно промываются трубопроводы, затем раствор антиформина пропускается в последующие емкости.

После освобождения аппарата сильной струей воды ополаскива-

ются внутренние поверхности аппарата и вся оснастка (змеевики, трапы, лестницы и др.). Затем через воздухораспределительную систему пропускают воду и давлением воздуха вытесняют вместе с водой остатки дрожжей из стояка, горизонтального распределительного коллектора и труб.

Трубки отвинчивают и каждую из них промывают струей воды из шланга, протирают специальными ершами, прополаскивают, поднимают наверх, тщательно осматривают, производят отбраковку и ремонт или замену неисправных трубок и после этого полный комплект пригодных трубок помещают в ванну с 1%-ным раствором каустической соды на 2–3 ч.

В этот период кистью смазывают все внутренние поверхности аппарата 1%-ным раствором каустической соды или 8%-ным раствором кальцинированной соды, закрывают аппарат и пропаривают в течение 30–40 мин. После этого поверхность легко отмывается струей воды с протиркой углов, змеевиков, тралов и лестниц щетками.

По истечении срока выдержки трубок в растворе соды раствор сливают, трубки промывают струей воды, протирают ершами и после проверки лабораторией завода опускают в аппарат.

Если вынуть наверх трубки не представляется возможным, мойку, отбраковку и замену трубок выполняют в аппарате.

Воздухораспределительную систему собирают после приемки аппарата лабораторией завода.

Одновременно с мойкой внутренней поверхности аппарата тщательно промывают вытяжные трубы над аппаратом, их смазывают раствором кальцинированной соды и промывают из шланга. Наружную поверхность аппарата тщательно промывают и убирают помещение под аппаратами.

Оборудование по всему технологическому циклу промывается, как указано выше.

После проведенной обработки все емкости и коммуникации заполняются растворами антисептиков на срок не менее 5 ч. По истечении срока выдержки раствор пропускают по всему технологическому потоку: мимо сепараторов, на сборники дрожжевого молока и за фильтр-прессы или через приемное корыто вакуум-фильтров.

Для достижения стерильности дрожжерастильных аппаратов их обрабатывают формалином или окуривают формалином с перманганатом калия.

Обработка формалином. 1 л формалина вливают в аппарат, закрывают крышкой, выдерживают 30–40 мин, пропаривают и продувают.

Окуривание формалином с перманганатом калия. На дно аппарата устанавливают ведро с техническим перманганатом калия. К ведру привязывают шланг, вторая сторона которого выводится наружу. Через шланг быстро вливают 40%-ный формалин, сбрасывают шланг и закрывают аппарат. Весь персонал удаляется из цеха. Через 30–40 мин продувают воздух, вытаскивают ведро и ополаскивают аппарат.

Формалин ($\text{CH}_2 = \text{O}$) – сильный восстановитель, он восстанавливается до муравьиной кислоты (НСООН). Перманганат KMnO_4 – сильный окислитель. При восстановлении перманганата марганец меняет валентность: из 7-валентного переходит в 6-валентный. Реакция экзотермическая; возникает мгновенное колоссальное повышение температуры, это приводит к возгонке формальдегида из раствора формалина.

После окуривания все оборудование и коммуникации ополаскивают и пропаривают до «пробы на утюг».

Нормы расхода химикатов для окуривания на 1 м³ емкости аппарата: 0,03 кг марганцовокислого калия и 0,03 л 40%-ного формалина.

Оборудование и транспортеры формовочного и сушильного отделений промывают холодной водой, затем моющими средствами и горячей водой. Не должно оставаться участков, щелей, зазоров непромытых и не продезинфицированных.

Панели, полы и наружные поверхности оборудования должны быть промыты с такой же тщательностью. Генеральную мойку совмещают с побелкой стен, подкраской конструкций и оборудования, проверкой и ремонтом вентиляей, средств автоматики и т. п.

Оборудование цеха ЧК и маточного порядка моется и дезинфицируется описанным выше способом после каждого цикла.

18.2. Дезинфекция оборудования для производства кормовых дрожжей

В производстве кормовых дрожжей дезинфекция оборудования производится: в холодное время года через каждые 20–30 дней, в теплое – через 10–15 дней, в зависимости от чистоты процесса.

Генеральная мойка и дезинфекция проводятся 1 раз в месяц.

Порядок мойки: ко всей производственной аппаратуре подключается пар избыточным давлением 1–2 атм. и горячая вода от дефлегматоров.

Вся аппаратура тщательно промывается и стерилизуется паром при температуре 105–110 °С в течение 60 мин. Одновременно пропариваются трубопроводы под избыточным давлением 0,5–1 атм.

По технологическому потоку прокачивается раствор дезинфицирующих веществ насосами высокого давления.

Для дезинфекции аппаратуры из нержавеющей стали запрещается применять хлорную известь и другие химикаты, содержащие хлор.

Для успешного проведения генеральной мойки составляют строгий график работ с указанием смен и исполнителей по всему технологическому циклу.

Дезинфекция оборудования четвертичными аммонийными соединениями. Перед дезинфекцией катапином или другими четвертичными аммонийными соединениями оборудование должно быть тщательно отмыто от остатков органических веществ и дрожжей, так как катапин способен с ними соединиться и снижать свое антимикробное действие.

В специальном сосуде готовят 0,02–0,06% -ный раствор препарата из расчета расхода его в количестве 10 л на емкость в 10 м³.

Препарат предварительно растворяют в соотношении 1–2 г на 1 л теплой воды, после растворения доводят теплой водой до нужной концентрации.

Дезинфицируемые поверхности можно обрабатывать с помощью садового опрыскивателя. Время контакта с антисептиком должно быть не менее 30 мин, после чего обрабатываемую поверхность тщательно промывают водой. Коммуникации заливают рабочим раствором антисептика и выдерживают 30–60 мин, затем тщательно промывают чистой водой.

По окончании дезинфекции раствор антисептика сливают из емкостей и трубопроводов и все тщательно промывают чистой водой.

Контролем на полноту промывания служит проба с индикатором бромкрезолпурпуром. Для проверки к 4–5 мл промывной воды добавляют 2 капли индикатора (0,1% -ный водный раствор).

При концентрации катапина 0,0025% появляется голубое окрашивание, хорошо заметное на белом фоне. При отсутствии катапина окраска индикатора не изменяется и остается фиолетовой.

Катапин сильно пенится, и отсутствие пены также свидетельствует о полной отмывке.

Вопросы

1. В каком режиме производится дезинфекция оборудования при производстве хлебопекарных дрожжей?
2. Какие дезинфицирующие средства применяются при производстве хлебопекарных дрожжей?
3. В каком режиме производится дезинфекция оборудования при производстве кормовых дрожжей?
4. Какие дезинфицирующие средства применяются при производстве кормовых дрожжей?

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

а) основная литература

1. Дзиццоева, З.Л. Перспективы использования *Candida parapsilosis* в производстве кормового белка / З.Л. Дзиццоева, А.М. Хозиев, В.Б. Цугкиева, Н.А. Улубиева // Известия Горского государственного аграрного университета. – 2017. – Т.54, ч.3. – С. 162.
2. Качмазов, Г.С. Дрожжи бродильных производств. Практическое руководство [Электронный ресурс]: учебное пособие / Г.С. Качмазов. – Электрон. текстовые дан. – СПб.: Лань, 2012. – 224 с.
3. Плиева, З.А. Культивирование разных видов и штаммов дрожжей на гидролизате из пивной дробины / З.А. Плиева, А.М. Хозиев // Международная научно практическая конференция «Научное обеспечение устойчивого развития АПК горных и предгорных территорий». Посвященная 95-летию Горского ГАУ 26–27 ноября 2013 г. – 2013.
4. Рамонова, Э.В. Биоконверсия навоза крупного рогатого скота с использованием штамма дрожжей *Hanseniaspora uvarum* / Э.В. Рамонова, А.М. Хозиев, Р.Г. Кабисов, З. Л. Дзиццоева // Достижения науки – сельскому хозяйству. Материалы Всероссийской научно-практической конференции (заочной). – 2017. – Т.1, ч.1. – С. 244.
5. Хозиев, А.М. Размножение дрожжей на питательной среде приготовленной на основе пивной дробины / А.М. Хозиев, З.А. Плиева // Известия ГГАУ. – Владикавказ, 2014. – Т.51, ч.3.
6. Хозиев, А.М. Технология биотрансформации послеспиртовой мелассной барды с целью получения кормового белка / А.М. Хозиев // Перспективы развития АПК в современных условиях. Материалы 7-й Международной научно-практической конференции 12–14 апреля 2017 г. – 2017. – С. 139.
7. Цугкиев, Б.Г. Получение микробного белка на основе питательной среды из зеленой массы горца сахалинского / Б.Г. Цугкиев, Н.Н. Каркусов, А.М. Хозиев // Известия ГГАУ. – 2014. – Т.51, ч.1. – С. 254.

б) дополнительная литература

8. Бабицкая, В.Г., Стахеев, И.В., Костина, А.М. и др. Образование белка смешанными культурами гриба *Penicillium digitatum* 24 П и дрожжей // Микробиол. пром-сть. 1977. Вып. 11 (153). С. 32–34.
9. Жвирблянская, А.Ю, Исаева, В.С. Дрожжи в пивоварении. – М.: Пищевая промышленность. 1979. – 246 с.
10. Тменов, И.Д. Использование кормовых дрожжей: учебное пособие / И.Д. Тменов, Б.Г. Цугкиев, В.Б. Цугкиева. – Владикавказ: ГГАУ, 2005. – 72 с.
11. Фараджева, Е.Д. Производство хлебопекарных дрожжей: практическое руководство / Е.Д. Фараджева, Н.А. Болотов. – СПб.: Профессия, 2002. – 167 с.
12. <http://soil.msu.ru/soilyeasts/pics/VegitoTypes.htm>.
13. <http://soil.msu.ru/soilyeasts/pics/AscosporeForms.htm>.
14. <https://helpiks.org/6-16080.html>.

ГЛОССАРИЙ

1. **Раса** – разновидность микроорганизмов, которые сохраняя все основные признаки данного вида отличаются второстепенными но стойкими признаками, характеризующими их производственные особенности.

2. **Гаплоид** – ядро, клетка, организм, характеризующиеся оди-нарным набором хромосом, представляющим половину полного на-бора, свойственного виду.

3. **Гибридизация** – комплементарный отжиг двух полинуклео-тидных цепей, обычно из разных источников, с образованием ДНК/ДНК – или ДНК/РНК-гибридов.

4. **Диплоид** – ядро, клетка, организм, характеризующиеся двой-ным набором гомологичных хромосом, представленных числом, ха-рактерным для данного вида (обозначают символом 2n).

5. **Хромосомы** – генетические структурные образования клетки, состоящие из ДНК и белков. В хромосомах заключена наследствен-ная информация организма.

6. **Зимазная активность** – способность дрожжей расщеплять сахарозу, а затем сбразивать образовавшуюся смесь глюкозы и фруктозы.

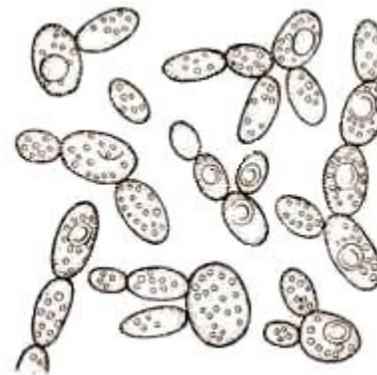
7. **Мальтазная активность** – способность дрожжей расщеплять мальтозу, а затем сбразивать образовавшуюся глюкозу.

8. **Эндоферменты** – ферменты, ускоряющие химические реак-ции процессов дыхания и брожения, а также те реакции, которые при-водят к образованию самой протоплазмы клетки.

9. **Экзоферменты** – ферменты, подготавливающие питательные материалы в окружающей среде, переводя нерастворимые и трудно диффундирующие в клетку соединения в растворимые и легкоусвая-емые.

10. **Дрожжевое молоко** – концентрированный дрожжевой раствор, получаемый после сепарации содержимого дрожжерастильного ап-парата с содержанием 400–750 г. дрожжей на один литр.

Saccharomyces vini (X2000).



Candida mycoderma (X800).



Дрожжи
Hansenula (X2000).



Дрожжи
Hanseniaspora apiculata (X2000).



Хозиев А.М. , Цугкиева В.Б. , Рамонова Э.В.

ПРОИЗВОДСТВО ДРОЖЖЕЙ

Учебно-методическое пособие
по дисциплине «Производство дрожжей»
для студентов, обучающихся по направлению подготовки
19.03.01 – «Биотехнология»
очной и заочной форм обучения

Квалификация – бакалавр

Лицензия: ЛР. № 020574 от 6 мая 1998 г.

Подписано в печать 17.12.2019 г. Бумага писчая. Печать трафаретная.
Бумага 60x84 1/16. Усл. печ. л. 14. Тираж 75. Заказ б.

362040, Владикавказ, ул. Кирова, 37.

Типография ФГБОУ ВО «Горский госагроуниверситет»