

Лабораторная работа № 9

Тема: Молочнокислое, спиртовое, маслянокислое брожение.

Наименование работы: Приготовление препарата молочнокислых бактерий.

Цель работы: поставить культуры на молочнокислое брожение, с помощью микроскопирования выявить виды молочнокислых микроорганизмов.

Задачи работы: провести качественное и количественное определение молочной кислоты в молоке качественными реакциями.

Оборудование: Свежее молоко, колбы на 100 мл, цилиндры на 100 мл, пипетки на 5 и 10 мл; 0,1 н. раствор NaOH, фенолфталеин, треножники с сеткой, микроскопы, воронки, фильтры, 10% - ный раствор AgNO₃, 13% -ный раствор NH₄OH, H₂SO₄ (плотность 1.84); 0,2% - ный спиртовой раствор тиофена, 5% - ный раствор KMnO₄, метиленовый синий.

Содержание и последовательность выполнения задания:

Молочнокислое брожение лежит в основе силосования, квашения овощей, переработки молока в молочнокислые продукты и сыр; кислый вкус черного хлеба определяется молочной кислотой. Эти процессы вызывают молочнокислые бактерии.

Молочнокислые бактерии можно разделить на две группы:

гомоферментативные, образующие из сахара в основном одну молочную кислоту
 $C_6H_{12}O_6 = 2CH_3CHOHCOOH$;

гетероферментативные, образующие наряду с молочной кислотой побочные продукты;
 $C_6H_{12}O_6 > CH_3CHOHCOOH + CH_3COOH + CH_3CH_2OH + CO_2$;
 $2C_6H_{12}O_6 = 2CH_3CHOHCOOH + 3CH_3COOH + CH_3CH_2OH$. (бифидоброжение)

Задание №1 Постановка опыта на молочнокислое брожение

1. Определяют начальную кислотность молока титрованием 0,1 н. раствором NaOH.
2. Разливают молоко в колбы Эрленмейера на 100 мл по 40-50 мл и закрывают ватными пробками. Параллельно молоко в колбах ставят на асбестовые сетки и доводят молоко до кипения.
3. Колбы с кипяченым и некипяченым молоком помещают в термостат при 30°C. Через 10-12 ч. некипяченое молоко скисает. В колбе образуется ровный плотный сгусток без следов газа. Сгусток получается в результате реакции молочной кислоты с казеинатом кальция и выпадения казеиновой кислоты в осадок. При кипячении молока молочнокислые бактерии, поскольку они не образуют спор, погибают, споры маслянокислых бактерий сохраняются. При инкубации в термостате они прорастают и осуществляют маслянокислое брожение лактозы. В результате реакции масляной кислоты с казеинатом кальция казеиновая кислота выпадает в осадок. В дальнейшем она подвергается пептонизации, в результате чего сыворотка приобретает кремовый цвет, неприятный запах и прогорклый вкус.

Микроскопирование молочнокислых бактерий

При хранении простокваши или рассола квашеных огурцов на поверхности образуется морщинистая пленка. Это молочная плесень - *Geotrichum candidum*, которая всегда сопутствует молочнокислому брожению, являясь его нежелательным спутником. Она окисляет молочную кислоту до углекислого газа и воды, снижая кислотность среды. В результате кисломолочные и квашеные продукты портятся, так как в среде происходит развитие гнилостных бактерий.

Молочная плесень - аэробная форма, поэтому развивается только на поверхности.

Для микроскопирования готовят препарат из прокисшего молока. Бактериологическую петлю вводят в сгусток и, повернув вокруг оси, извлекают, прикасаясь ею к пленке, которую образует молочная плесень. Сгусток размазывают по предметному стеклу очень тонким слоем без воды.

Сушат на воздухе. Фиксируют смесью спирта с эфиром (1:1), несколько раз нанося смесь на мазок и сливая ее. При такой фиксации не только погибают и прикрепляются к стеклу бактерии, но и с помощью эфира извлекается и удерживается жир, капли которого на препарате мешают окраске и микроскопированию.

Результат работы:

Рисунок молочнокислые бактерии.

При микроскопировании (рисунок 10) на мазке отчетливо видно палочковидные бактерии с округлыми концами, сцепленные друг с другом в длинные или короткие цепочки.

Задание 2. Спиртовое брожение.

Цель работы: изучение дрожжей, способных к спиртовому брожению

Задачи работы: подготовить препараты для дальнейшего микроскопирования дрожжей.

Оборудование: Сахароза, раствор с массовой долей 15%, дрожжи, гидроксид натрия, водный раствор с массовой долей 10 %, раствор Люголя.

Ход работы:

Многие микроорганизмы содержат ферменты, вызывающие спиртовое брожение, однако практическое значение имеет лишь спиртовое брожение, вызываемое дрожжами. Дрожжи сбрасывают углеводы с образованием этилового спирта и углекислого газа по схеме:



Таблица 1

Порядок выполнения работы

Ход работы	Выполнение, наблюдение
В пластиковую бутылку вносим 15,05 г сахара и 0,75 г дрожжей, и добавляем туда 100 мл воды. Бутылку закрываем пробкой, но неплотно для того, чтобы мог выделяться углекислый газ. Бутылку взвешиваем и ставим в теплое место. Брожение обычно продолжается 3-4 дня.	Массу углекислого газа, выделившегося при брожении, определяем по разнице масс до брожения и после брожения.

Определение интенсивности брожения производит соответствие со схемой опыта, описанной в таблице 2:

Таблица 2

Обнаружение этилового спирта

Ход работы	Выполнения, наблюдения
В пробирку наливаем 5 капель раствора полученного после брожения. Добавляем 5 капель раствора Люголя и 5 капель раствора гидроксида натрия. Содержимое пробирки нагреваем до кипения.	В процессе нагревания ощущается запах йодоформа, образующегося из этанола.

Результат работы:

При определении количества, выделенного газа измерили массу колб и установили:

Мдо= 141,8 г

Мпосле= 121,3г

Разница составила- 20,5 г.

Задание 3. Маслянокислое брожение

Цель работы: Возбудителями маслянокислого брожения являются анаэробы, подвижные палочки с кластридиальным или плектридиальным типом спорообразования. По преобладанию тех или иных конечных продуктов брожения можно разделить:

1. Истинное маслянокислое;
2. Ацетонбутиновое;
3. Пектиновое.

Спорообразующие бактерии содержатся в почве или на кожуре картофеля. В нашем опыте было изучено маслянокислое брожение крахмала, протекающее по схеме:



Оборудование: Картофель, мел, вода водопроводная, культуральная жидкость, серная кислота, конц, спирт этиловый, раствор с массовой долей 96%.

Ход работы:

Сырой неочищенный картофель нарезают кубиками, заполняют 1/3 высокой пробирки, добавляют немного мела для устранения кислой среды и заполняют водопроводной водой на 2/3. Пробирку помещают на водяную баню при 80 0С на 10 минут для пастеризации. Через 2 дня картофель всплывает вследствие бурноидущего газообразования. По окончании брожения культуральную жидкость используют для качественного определения продуктов брожения. В пробирку вносят 5 мл культуральной жидкости и добавляют 2 мл серной кислоты, 0,5 мл этилового спирта. При взбалтывании и нагревании появляется характерный запах ананаса, что свидетельствует об образовании масляноэтилового эфира [5].

Результат работы:

В результате проведения опыта было получено маслянокислое брожение. Вода имела резкий ананасовый запах, характерный для этого вида брожения.

Задание 4. Уксуснокислое брожение.

Цель работы: Образование уксусной кислоты (неполное окисление) -- это окисление бактериями этилового спирта в уксусную кислоту:

Задачи работы: получить уксуснокислое брожение этилового спирта с применением бактерий рода *Acetobacter*.

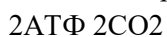
Ход работы:

Проведение опыта осуществляли по схеме:

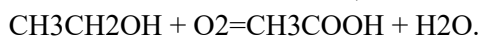
Сбраживание глюкозы бактерией *Ruminococcus albus*.



Глюкоза Пируват Ацетат



1 моль глюкозы = 2 ацетата, 2 CO₂ и 4H₂, 4АТФ.



Результат работы: по окончании проведения опыта было получено уксуснокислое брожение, продукт имел резкий уксусный запах, что характеризует развитие рода *Acetobacter*.