

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Молочнокислое брожение

Цель: познакомиться с химизмом молочнокислого брожения, с качественными реакциями на молочную кислоту, с морфологией молочнокислых бактерий.

Материалы и оборудование: свежее и кислое молоко, ряженка, простокваша, кислые сливки, сметана, кефир, сливочное масло, рассолы капусты, огурцов, 0,1 н р-р NaOH, 10-процентной серной кислоты, насыщенный р-р CuSO₄, 2-процентного спиртового тиофена, 2-процентный р-р KMnO₄, 0,5-процентный аммиачный р-р AgNO₃, спиртовой 5-процентный р-р фенола, концентрированная H₂SO₄, 5-процентный р-р FeCl₃, р-р фенолфталеина, водный р-р метиленового синего, жидкость Никифорова, р-р генцианвиолета, р-р люголя, 96-процентный спирт, р-р карболового фуксина, дистиллированная вода, колбы на 50 мл, пипетки на 10 мл, фильтровальная бумага, вата, предметные стекла, спиртовки, микроскопы, настольные лампы, стеклянные штативы с кристаллизаторами, промывалки.

ХОД РАБОТЫ

1. Сделать качественные реакции на молочную кислоту, записать уравнения реакций.

2. Определить кислотность молока, вычислить количество молочной кислоты в 100 мл молока и увеличение кислотности по мере скисания молока.

3. Познакомиться с морфологией молочнокислых бактерий. Приготовить препараты, окрасить метиленовым синим и по Граму, рассмотреть с иммерсией, зарисовать.

Брожение – эволюционно наиболее древний и примитивный способ получения энергии, характерный для ряда групп прокариот. Основные типы брожений – спиртовое, молочнокислое и маслянокислое – открыты Л. Пастером (1860-е годы), хотя продукты брожений были известны человеку с незапамятных времен.

Химизм молочнокислого брожения

Молочнокислое брожение вызывается молочнокислыми бактериями, которые с помощью ферментов сбраживают молочный сахар (лактозу) и любой другой сахар (глюкозу) до молочной кислоты и других продуктов:



Процесс идет с накоплением энергии в виде АТФ. По характеру брожения молочнокислые бактерии делятся на две группы: гомоферментативные, когда продукт разложения – молочная кислота, и гетероферментативные, вызывающие образование, кроме молочной кислоты, других продуктов брожения: спирта, уксусной кислоты, CO₂ и др.

К первой группе относятся: молочнокислый и сливочный стрептококки, ацидофильная и болгарская палочки.

Представители гомоферментативного брожения

МОЛОЧНОКИСЛЫЙ СТРЕПТОКОКК (*Streptococcus lactis*)

Имеет вид овальных кокков диаметром 0,5–1 мкм, которые располагаются в культуре попарно. Это диплококки, а короткими цепочками – стрептококки. Микроорганизмы грам(+), оптимальная температура развития – 30–35°C. Сбраживает молочный сахар (лактозу), а также мальтозу. Молоко свертывается через 10–12 часов.

СЛИВОЧНЫЙ СТРЕПТОКОКК (*Streptococcus cremoris*)

Встречается в молочнокислых продуктах с большой жирностью, имеет вид более длинных цепочек. Используется для производства масла, сыров и сметаны.

БОЛГАРСКАЯ ПАЛОЧКА (*Lactobacterium bulgaricum*)

Неподвижная, грам(+), располагается в виде отдельных клеток и коротких цепочек. Оптимальная температура ее развития – 40–45°C.

АЦИДОФИЛЬНАЯ ПАЛОЧКА (*Lactobacterium acidophilum*)

По морфологии близка к болгарской палочке, но имеет другой температурный оптимум развития – 37°C. Используется для изготовления ацидофилина.

ОГУРЕЧНАЯ ПАЛОЧКА (*Lactobacterium cucumeris*)

Короткая, грам(+) бактерия, неподвижная. Развивается в рассоле засоленных огурцов, капусты, в силосе.

Ко второй группе гетероферментативных бактерий относятся капустная палочка, ряд лактобацилл (*Lactobacillus plantarum*, *L. fermenti*, *L. brevis*), а также кефирные дрожжи и молочная плесень. Микроорганизмы этой группы чаще встречаются в заквашенных овощах и силосе. Молочнокислые бактерии широко распространены в природе. Они всегда имеются в почве, на поверхности растений, что является источником их постоянного появления в молочных и других продуктах. В промышленности используют культурные расы бактерий, которые имеют ряд преимуществ перед дикими формами.

Представители гетероферментативного брожения

КАПУСТНАЯ ПАЛОЧКА (*Lactobacterium brassicae*)

Вместе с огуречной встречается в заквашенных овощах, грам(+), сцеплена в пары и цепочки. Оптимум развития – 25 °С. В молочнокислых продуктах можно встретить и пропионовых бактерий, попадающих в молоко из почвы и с растений. Им принадлежит значительная роль при созревании сычужных сыров.

КЕФИРНЫЕ ДРОЖЖИ (*Saccharomyces kefir*), переводящие молочный сахар (лактозу) в спирт, небольшое количество которого вырабатывается этими организмами.

МОЛОЧНАЯ ПЛЕСЕНЬ (*Oidium lactis*)

Можно обнаружить сверху на молочнокислых продуктах, имеет мицелий, распадающийся на четырехугольные или овальные клетки, отличающиеся сравнительно большими размерами. Окисляет молочную кислоту до CO₂ и воды, ухудшая качество скисшего молока.

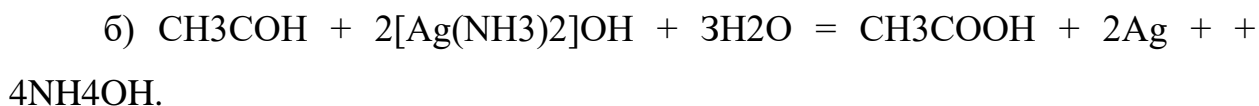
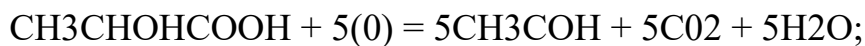
Качественные реакции на молочную кислоту

1. Определение уксусного альдегида

Кислое молоко фильтруют через складчатый фильтр, к 10 мл фильтрата добавляют 1 мл 10-процентного раствора серной кислоты, нагревают в конической колбе до кипения, затем по каплям прибавляют 2-процентный р-р (2 мл) $KMnO_4$. В этих условиях происходит окисление молочной кислоты с $KMnO_4$ до CH_3COH (уксусный альдегид):



Затем покрывают горлышко колбы фильтровальной бумагой, смоченной аммиачным раствором оксида серебра (смачивают бумагу вначале 0,5-процентным раствором $AgNO_3$, затем раствором NH_4OH . Бумага темнеет под влиянием паров уксусного альдегида:



2. Реакция Уффельмана (проба с фенолом)

В пробирку к 10 мл 5-процентного р-ра фенола добавить несколько капель 5-процентного раствора хлорного железа ($FeCl_3$). Наблюдаем образование интенсивно окрашенного синего раствора. Прибавление одной-двух капель сыворотки кислого молока, содержащей молочную кислоту, делает раствор желтоватым.

3. Реакция со спиртовым раствором тиофена

Кислое молоко фильтруют через складчатый фильтр. К 2 мл фильтрата добавляют 5 мл концентрированной серной кислоты и 10 капель насыщенного раствора медного купороса. Нагревают при потряхивании на водяной бане при $100^\circ C$ в течение 5 мин. При охлаждении добавляют три-пять капель 0,2-процентного раствора тиофена в спирту. В присутствии молочной кислоты возникает вишнево-красное окрашивание.

Определение кислотности молока

В широкодонную колбу объемом 150 мл наливают 40 мл свежего молока, закрывают ватной пробкой и помещают в термостат при температуре $30-35^\circ C$ до следующего занятия. В другой порции молока определяют его

исходную кислотность. Для этого в коническую колбу на 50 мл наливают 10 мл молока, добавляют 20 мл дистиллированной воды и две-три капли фенолфталеина. Смесь тщательно взбалтывают и титруют 0,1 н раствором едкого натра до слабозеленой окраски индикатора. Рассчитывают кислотность в градусах Тернера. Градус Тернера ($^{\circ}\text{T}$) – условная величина, равная количеству миллилитров 0,1 н раствора щелочи, израсходованного на нейтрализацию 100 мл молока.

Пример расчета: на титрование 10 мл молока пошло 5 мл 0,1 н раствора щелочи; рассчитаем количество щелочи, израсходованное на титрование 100 мл молока:

5 мл щелочи – 10 мл молока;

x мл щелочи – 100 мл молока.

Кислотность в градусах Тернера составит:

$$X = 5 \cdot 100/10 = 50^{\circ}\text{T}.$$

Кислотность парного молока колеблется от 10 до 25 $^{\circ}\text{T}$. Предельная кислотность молока колеблется от 110 до 115 $^{\circ}\text{T}$.

Приготовление препаратов из молочнокислых продуктов

Нанести одну каплю какого-либо молочного продукта на предметное стекло, разбавить с каплей дистиллированной воды и сделать тонкий мазок, чуть подсушить на воздухе, а затем зафиксировать с одновременным обезжириванием смесью Никифорова (не менее 10 мин.). Окраску производят в течение 3–5 мин. водным раствором метиленового синего, промывают водой, высушивают и микроскопируют с применением иммерсионного микроскопа.

Микрофлору рассолов капусты и огурцов препарируют обычным способом, без обезжиривания смесью Никифорова. Окраску мазка производят метиленовым синим или карболовым фуксином 3–5 мин.