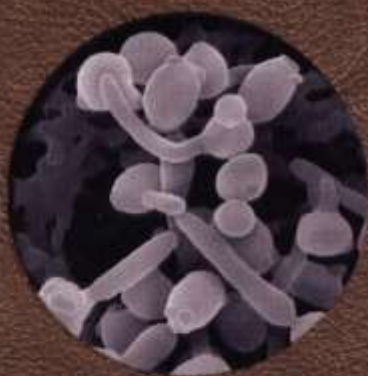


Г. С. Качмазов

ДРОЖЖИ БРОДИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДСТВ

Практическое руководство



Г. С. КАЧМАЗОВ

ДРОЖЖИ БРОДИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДСТВ

ПРАКТИЧЕСКОЕ РУКОВОДСТВО

Учебное пособие

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ •
МОСКВА •
КРАСНОДАР •
2012 •



Г.С. Качмазов

Дрожжи бродительных производств

Методы

Практическое руководство

Владикавказ 2010

Рецензенты:

- С.И. Хорунжина** – профессор кафедры «Технология бродильных производств и консервирования», доктор технических наук (Кемеровский технологический институт пищевой промышленности).
- И.А. Еремина** – доцент кафедры «Технология бродильных производств и консервирования», кандидат технических наук (Кемеровский технологический институт пищевой промышленности).
- Л.В. Пермякова** – доцент кафедры «Технология бродильных производств и консервирования», кандидат технических наук (Кемеровский технологический институт пищевой промышленности).

**Рекомендовано к печати кафедрой «Технология пищевых продуктов»
Северо-Осетинского государственного университета им. К.Л. Хетагурова.**

В руководстве изложены лабораторные методы выделения чистых культур, селекции, технологического контроля и оценки состояния дрожжей, используемых в различных отраслях бродильной промышленности и на хлебопекарных предприятиях.

"Практическое руководство" включает методы анализа, разработанные автором, а также, заимствованные из ранее изданных руководств.

Руководство предназначено для лабораторно-практических занятий студентов технологических факультетов высших и средних специальных учебных заведений.

Так же руководство может успешно использоваться микробиологами и технологами предприятий бродильной и хлебопекарной промышленности для проведения рутинных микробиологических анализов.

Оглавление.

Введение.....	10
Дрожжи рода <i>Saccharomyces</i>.....	14
Изменения в номенклатуре дрожжей <i>Saccharomyces</i> (1952 – 1990).....	15
Видовая принадлежность дрожжей <i>Saccharomyces</i> (по Кудрявцеву).....	16
Видовая принадлежность дрожжей <i>Saccharomyces</i> (по Яргоу).....	17
Морфология и вегетативное размножение.....	18
Характеристика вегетативных клеток.....	18
Вегетативное размножение.....	19
Микроскоп и техника микроскопирования.....	20
Световой микроскоп.....	21
Дополнительные оптические системы.....	26
Фазово-контрастное устройство.....	26
Темнопольный конденсор.....	27
Микроскопия.....	28
Методы исследования микроорганизмов в светопольном микроскопе.....	29
Приготовление препаратов.....	29
Приготовление живых препаратов.....	29
«Раздавленная капля».....	30
«Висячая капля».....	31
Приготовление фиксированных препаратов.....	31
Определение размеров клеток микроорганизмов.....	34
Объективный микрометр (объект-микрометр).....	34
Окулярный микрометр (окуляр-микрометр).....	35
Винтовой окулярный микрометр.....	35
Методы окраски микроорганизмов и цитохимические методы исследования дрожжей.....	36
Простая окраска микроорганизмов.....	36
Окраска спор дрожжей.....	37
Метод Виртца.....	37
Карбол-фуксиновая окраска.....	37
Вариант 1.....	37
Вариант 2.....	37
Определение гликогена в клетках дрожжей.....	37
Окраска волютина.....	38
По методу Омелянского.....	38
По методу Леффлера.....	38
Окраска микроорганизмов по Граму.....	39
Краски.....	39
Метиленовый синий (насыщенный спиртовой раствор).....	39
Метиленовый синий 1:40.....	39
Метиленовый синий щелочной (синька Леффлера).....	39
Разбавленная синька (по Финку).....	39
Основной фуксин.....	40
Карболовый фуксин (по Цилю).....	40
Разбавленный фуксин (по Пфейферу).....	40
Малахитовый зеленый (водный насыщенный раствор).....	40
Сафранин (водный раствор).....	40
Насыщенный спиртовой раствор генцианвиолета (для окраски по Граму).....	40

<i>Растворы йода в йодистом калии (по Люголю).....</i>	40
<i>Раствор Люголя для окраски по Граму.....</i>	40
<i>Раствор Люголя для выявления гранулезы.....</i>	41
<i>Раствор Люголя для выявления гликогена.....</i>	41
<i>Раствор туши.....</i>	41
<i>Традиционный метод.....</i>	41
<i>Метод Литтмана.....</i>	41
Методы стерилизации посуды и питательных сред.....	41
Стерилизация обжиганием на пламени горелки.....	42
Стерилизация кипячением.....	42
Стерилизация сухим жаром.....	42
Стерилизация текучим паром – дробная стерилизация или тиндализация....	43
Пастеризация.....	43
Холодная стерилизация.....	44
Стерилизация паром под давлением – автоклавирование.....	44
Правила работы с автоклавом.....	44
Питательны среды.....	46
Среды общего назначения.....	46
Солодовое сусло.....	47
Мелассовое сусло.....	47
Сусло-агар.....	48
Скошенный сусло-агар.....	48
Полужидкий сусло-агар.....	48
Ацетатная среда для выделения посторонних дрожжей.....	49
Среда с монойодуксусной кислотой.....	49
Сусло-желатин.....	49
Среда Сабуро для выращивания дрожжей.....	49
Синтетическая среда с лизином.....	49
Среда 10 для выявления и подсчета лактобактерий и лейкопостока.....	50
Молочный агар Богданова.....	50
Виноградное сусло.....	50
Вино с сахаром.....	51
Вино с суслом.....	51
Виноградное сусло разбавленное.....	51
Яблочное сусло.....	51
Смесь солодового сусла с яблочным.....	51
Капустная среда.....	51
Картофельная вода.....	52
Дрожжевая вода.....	52
Дрожжевой автолизат.....	52
Стерильный мел.....	54
Стерильная водопроводная вода.....	54
Среды накопительные для дрожжей.....	54
Среды для аскоспорообразования.....	54
Среда Городковой для выявления спор у дрожжей.....	54
Ацетатный агар Фоувелла.....	55
Ацетатный агар Мак-Клари.....	55
Среда с дрожжевым экстрактом и глюкозой.....	55
Агаризованная дрожжевая вода.....	55
Среда Старки.....	55
Овощной агар.....	56
Гипсовые блоки.....	56

Освещение сред.....	57
Питательные среды и условия хранения чистых культур дрожжей.....	57
Периодические пересевы.....	58
Хранение под минеральным маслом.....	59
Лиофилизация.....	60
Методы криогенного хранения.....	62
Хранение на адсорбентах.....	63
Хранение культур винных дрожжей в виде спор.....	63
Хранение микробных культур под вакуумом (<i>метод Сорделли</i>).....	64
Хранение коллекционных культур в дистиллированной воде (<i>метод Кастеллани</i>).....	64
Хранение в манните.....	64
Хранение маточных хлебопекарных и спиртовых дрожжей.....	65
Культуральные свойства.....	66
Рост на плотных средах.....	66
Рост в жидких средах.....	70
Выделение чистой культуры.....	70
Прямые методы.....	71
Капельный способ Линднера.....	71
Метод Линднера, упрощенный Вучковичем.....	71
Выделение спор дрожжей при помощи микроманипулятора.....	72
Непрямые методы.....	72
Метод отбора наиболее активной культуры.....	74
Стандартный метод.....	74
Модифицированный метод отбора наиболее активной культуры***.....	75
Выбор наиболее активной культуры манометрическим методом***.....	76
Жизнеспособность дрожжей.....	78
Определение жизнеспособности дрожжей по степени окисления.....	79
Определение количества мертвых клеток.....	79
Дифференциальное окрашивание метиленовым синим.....	79
Люминесцентный метод.....	80
Метод эпифлуоресценции.....	81
Методы количественного учета дрожжей.....	81
Методы микроскопирования.....	83
Подсчет клеток в счетных камерах.....	83
Капиллярный метод прямого счета микроорганизмов.....	84
Комплексный подсчет клеток в счетных камерах***.....	85
Подсчет клеток в фиксированных окрашенных препаратах (<i>метод Виноградского-Брида</i>).....	86
Подсчет клеток на мембранных фильтрах.....	88
Методы высева на питательные среды.....	89
Определение количества клеток высевом на плотные питательные среды (<i>метод Коха</i>).....	89
Упрощенный количественный учет дрожжей.....	92
Определение количества клеток с использованием прибора вакуумной фильтрации.....	93
Устройство прибора и порядок работы с ним.....	93
Стерильные мембранные фильтры.....	95
Питательные картонные подложки.....	98
Определение биомассы взвешиванием.....	98
Оптические методы количественного учета.....	100
Определение количества клеток и биомассы нефелометрическим методом.....	100
Стандарты мутности и их применение.....	100
Физиологические признаки.....	101

Определение интенсивности брожения и дыхания.....	101
Сбраживание сахаров.....	103
Избирательное сбраживание глюкозы и фруктозы.....	108
Зимазная, инвертазная и мальтазная активность.....	108
Газометрический способ.....	109
Манометрический способ***.....	110
Продукты брожения.....	112
Потребность в витаминах.....	113
Рост на средах с повышенным осмотическим давлением.....	113
Отношение к концентрации хлористого натрия.....	114
<i>На жидких средах.....</i>	114
<i>На жидких средах с использованием поплавков.***.....</i>	115
<i>На полужидких средах.***.....</i>	115
<i>На плотных средах.....</i>	116
<i>По разнице в подъемной силе.....</i>	116
Отношение к концентрации глюкозы.....	117
<i>Стандартный метод.....</i>	117
<i>В полужидком глюкозно-дрожжевом агаре***.....</i>	118
Отношение к температуре.....	118
Определение оптимальной температуры для роста.....	118
Холодо- и термоустойчивость дрожжей.....	119
Спиртообразующая способность – кривые брожения.....	120
Спиртоустойчивость.....	120
Стандартный метод.....	121
Метод серийных разведений***.....	121
Кислотоустойчивость.....	123
Флокуляция.....	124
Определение флокуляционной способности.....	124
<i>Метод ЧССР.....</i>	124
<i>Метод Варна.....</i>	124
<i>Метод Хельма.....</i>	125
<i>Метод Йошида.....</i>	126
Образование мицелия.....	127
Определение фенотипов киллер, нейтральный, чувствительный.....	128
Технологические критерии оценки.....	129
Удельная скорость роста.....	129
Бродильная активность.....	130
Определение по скорости спиртового брожения.....	130
Определение по количеству этанола.....	131
Объемный способ.....	133
Манометрический метод определения бродильной активности***.....	134
Степень сбраживания***.....	135
Подъемная сила.....	136
Подъемная сила прессованных дрожжей.....	136
<i>Стандартный метод.....</i>	136
<i>«По шарик».....</i>	137
Подъемная сила сухих дрожжей.....	137
Сульфитостойкость винных дрожжей.....	138
Способ 1.....	138
Способ 2.....	138
Технологическая устойчивость культуры – «автолизное число»***.....	139
Формольное число.....	140

Способ 1.....	140
Способ 2.....	141
Подготовка дрожжей к брожению.....	141
Лабораторная стадия разведения***.....	141
Методы реактивации сухих дрожжей.....	143
Размачивание дрожжей при повышенной температуре.....	143
Предварительное обводнение.....	143
Реактивация винных сухих дрожжей.....	144
Реактивация спиртовых сухих дрожжей***.....	144
Проверка чистоты культуры.....	146
Просмотр культуры под микроскопом.....	147
Метод микрокультуры.....	147
Посев на чашки Петри.....	148
Посев на селективную питательную среду.....	148
Повседневный микробиологический контроль процесса выращивания хлебопекарных дрожжей.....	149
Обеззараживание дрожжей ЧК и ЕЧК перед засевом.....	150
Обработка серной кислотой (кислотная баня).....	150
Обработка молочной кислотой.....	150
Обработка смесью молочной и борной кислот.....	151
Обработка фуразолидоном.....	151
Обработка перекисью водорода.....	151
Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.....	151
Метод диффузии в агар (метод бумажных дисков).....	151
Метод серийных разведений.....	152
Метод серийных разведений в жидкой питательной среде.....	153
Метод серийных разведений на плотной питательной среде.....	154
Влажность прессованных и сухих дрожжей.....	154
Арбитражный метод.....	154
Ускоренные методы.....	155
Экспресс-метод.....	155
Пленчатый способ.....	155
Высушивание в приборе ВНИИХП-ВЧ.....	156
Кислотность дрожжей.....	157
Арбитражный метод.....	157
Метод электротитрования.....	158
Химический состав биомассы дрожжей.....	158
Определение общего азота в прессованных дрожжах.....	158
Определение фосфорного ангидрида в дрожжах.....	161
Метод Бриггса.....	161
Визуальный метод.....	161
Фотозлектроколориметрический метод.....	162
Определение содержания золы.....	163
Определение содержания глутатиона.....	164
Стойкость при хранении.....	165
Стойкость прессованных дрожжей.....	165
Определение стойкости дрожжей при температуре от 0 до + 4°C.....	165
Определение стойкости дрожжей в термостате при 35°C (ускоренный метод).....	165
Шведский метод.....	165
Стойкость сушеных дрожжей.....	166

Технологические требования.....	166
Основные требования к хлебопекарным дрожжам.....	166
Основные требования к спиртовым дрожжам***.....	167
Основные требования к дрожжам виноделия.....	167
Основные требования к пивным дрожжам.....	168
Список литературы.....	170

*** Здесь и далее обозначены методики, разработанные, модифицированные или дополненные автором.

Введение.

«Природа навсегда останется сложнее любых парадигм. Уже хорошо, что нам дано понемногу ее узнавать, и хорошо бы еще при этом использовать наши знания для сохранения того, что осталось от природы как она есть, а не переделывать ее неведомо во что».

Хаитов Р.М. — академик РАМН, профессор, лауреат Государственной премии в области науки и техники.

Перечень технологических требований, предъявляемых к дрожжам в различных отраслях пищевой промышленности достаточно широк. Они основываются на морфологических и физиологических особенностях, составляющих родовые, видовые, расовые и штаммовые признаки. Совокупность их должна обеспечить наиболее эффективное использование производственной культуры, являющейся главным звеном технологической цепи.

Совершенствование традиционных технологий, имеющих свои бесспорные преимущества, позволяет ускорить течение биохимических процессов в ограниченных пределах. Однако современные экономические условия требуют максимального повышения эффективности производства, которое может быть достигнуто благодаря интенсификации технологических процессов на каждом этапе. Применяя сложную технику и передовые технологии, ни в коем случае не следует забывать о дрожжевой клетке — основном действующем агенте, живом микроорганизме, на жизнедеятельности которого базируется вся технология. Сбраживаемый субстрат должен рассматриваться не иначе, как временная среда обитания, пусть микроскопического, но живого организма, как многокомпонентная система, в которой происходят сложнейшие физиологические и биохимические процессы, обеспечивающие активную деятельность живой клеточной популяции. Между клеткой и средой устанавливаются сложнейшие взаимоотношения, которые необходимо понимать и с учетом которых следует регулировать физико-химические параметры среды, прямо или косвенно влияющие на функции дрожжей.

При неоспоримой важности и необходимости грамотного управления каждой ступенью аппаратурной и технологической схемы производства основная задача технолога, заключается в обеспечении оптимальности режимов биологической компоненты технологического процесса. Режимы эти должны быть скорректированы таким образом, чтобы дрожжевая клетка, как главный участник технологического процесса, находилась в условиях, позволяющих ей полностью проявить свои физиологические возможности и, эффективно используя эти условия, производила продукт нужного и управляемого качества. Все предшествующие операции должны быть мотивированы решением именно этой задачи. Управление процессами

дрожжегенерации, брожения и дображивания, максимальное использование ферментативной активности дрожжей невозможно без глубоких знаний биологии клетки. С этой точки зрения, бесспорно, что физико-химические параметры субстрата на всех стадиях технологического процесса играют решающую роль в формировании качественных показателей конечного продукта.

Ферментативная активность, безусловно, является наиболее важным из совокупности признаков, характеризующих производственный потенциал расы. Это, по сути, показатель способности дрожжевой популяции быстро и эффективно взаимодействовать с окружающей средой для обеспечения собственных потребностей в метаболитах энергетического и конструктивного назначения.

Правильный ход технологического процесса и получение продукции высокого качества зависит от состояния дрожжевой клетки. С момента вовлечения дрожжевой клеточной массы в технологический процесс (от чистой культуры и далее) все операции должны быть направлены на то, чтобы разводочный цикл, главное брожение и дображивание протекали в оптимальном режиме не только по экономическим, но и по физико-биохимическим параметрам. В рамках только такого режима здоровая биомасса может сформировать требуемый комплекс качественных показателей, предъявляемых к конкурентоспособному конечному продукту.

Следует, к сожалению, признать, что соблюдение и даже опережение регламентированных технологических режимов сбраживания зачастую достигается не за счет физиологически обоснованной высокой генеративной и бродильной активности дрожжей, а путем применения недопустимых, с точки зрения физиологии, технологических приемов. К таковым, в первую очередь, следует отнести повышение температуры брожения и увеличение дозы засева.

Например, требует пояснения, сложившееся понимание термина "термотолерантность" или "термоустойчивость". В биологическом смысле этот термин не является синонимом "термофильности" и указывает на то, что данная раса дрожжей способна какое-то время сохранять свою жизнеспособность при более высоких температурах. Именно "сохранять", что не значит "нормально функционировать". Но, с точки зрения физиологии клетки и биохимии брожения важно другое – каким образом, с какой скоростью и с каким результатом протекают биохимические процессы внутри и вне клетки при повышении температуры среды. В условиях длительной гиперфункции, вызванной повышенной температурой, клетка, в энергетически неэффективных анаэробных условиях, становится неспособной обеспечить завершение всего комплекса биохимических процессов, образуя большое количество продуктов незавершенного метаболизма и, как защитная реакция, вынуждена выбрасывать их в окружающую среду, существенно изменяя химический состав субстрата. Но, кроме того, большинство этих продуктов, сами, являясь химически и биологически активными соединениями, а некоторые из них и токсичными,

еще больше искажают нормальные обменные процессы в клетке, особенно при повышенных температурах. Важнейшее значение этот механизм приобретает применительно к сухим дрожжам.

Важнейшими признаками любого живого организма, отличающими его от всего неживого, являются наследственность и изменчивость. Дрожжевая клетка в этом смысле не является исключением. Сохраняя основные генетически закрепленные наследственные признаки, изменчивость дрожжевой клетки определяется ее способностью активно реагировать на совокупность внешних факторов и адаптироваться к ним с целью сохранения жизнеспособности популяции в целом. Приспосабливаясь к условиям внешней среды, популяция способна сохранять вновь приобретенные признаки в большем или меньшем количестве последующих генераций, а с точки зрения технологических требований приобретать, как положительные, так и отрицательные свойства, характеризующие ее производственные особенности. Вероятно, поэтому, чистые культуры дрожжей, выделенные из производственных субстратов некоторых предприятий, зачастую дают результаты, отличающиеся от таковых чистой культуры лабораторных коллекций.

Селекция физиологически активных штаммов дрожжей, устойчивых к неблагоприятным факторам, обладающих повышенной продуктивностью и прочими положительными свойствами без ущерба для качества позволяют повысить эффективность производства за счет интенсификации процессов дрожжегенерации и брожения. Но в настоящее время по причинам, рассмотрение которых не входит в наши задачи, селекционная работа с культурными расами дрожжей полностью сосредоточена в отраслевых НИИ и НИЛ. Однако ввиду объективных и субъективных обстоятельств каждое предприятие имеет свои особенности, связанные с технологическими, природно-климатическими и другими условиями, что позволяет рассматривать его, как самостоятельную экологическую единицу, активно воздействующую на используемую дрожжевую популяцию. Реагируя на совокупность внешних факторов, данная популяция через естественные биологические механизмы адаптации приобретает, в технологическом смысле, как отрицательные, так и положительные свойства.

Нельзя отрицать, что при таких обстоятельствах производственные лаборатории могут внести значительный вклад в поиск, выделение и отбор культур дрожжей с новыми, с точки зрения технологических требований, положительными признаками. Обладая доступными и легко воспроизводимыми методами, правильно интерпретируя полученные результаты, заводские микробиологические лаборатории вполне способны вести селекционную работу, хотя бы в рамках требований собственного предприятия. Исходя, главным образом, из этих соображений в руководство включены методы, не требующие сложного и дорогостоящего оборудования. Кроме того, там, где это возможно, сознательно исключены ссылки на отраслевую специфичность, т.к. многие из приведенных методик универсальны и с успехом могут использоваться в любой отрасли,

использующей дрожжи *Saccharomyces* в качестве специфической микрофлоры. В виноделии и производстве кормовых дрожжей эти же методики могут использоваться для технологической оценки дрожжей, принадлежащих к другим таксономическим группам.

Непременным условием получения объективных результатов при изучении физиологии любого микроорганизма является работа с чистой культурой. Выделение отдельных видов микроорганизмов и получение чистой культуры – основа микробиологической техники. При этом в доэкспериментальный или допроизводственный период культура непременно должна находиться в условиях, сбалансированных по всем возможным параметрам, максимально приближенным к физиологически оптимальным. Иными словами, любые лабораторные действия, производимые с исследуемой клеточной массой перед началом эксперимента или производственным использованием не должны нанести сколько-нибудь значимый вред общему физиологическому состоянию клетки и биомассы в целом.

Высокое качество продукции, конечно, невозможно обеспечить без хорошо продуманного и строго выполняемого контроля производства. Необходимость постоянного совершенствования организации и структуры технокимического и микробиологического контроля, формирование системы показателей пооперационного контроля производства, качества сырья, методов анализа и их приборного обеспечения предопределяется переходом на интенсивные методы производства.

Надеемся, что настоящее «Руководство» окажет значимую практическую помощь производственным микробиологическим лабораториям, как в освоении основ микробиологической техники, так и в активном использовании их исследовательского потенциала.

Дрожжи рода *Saccharomyces*.

Клетки круглые и овальные, иногда удлинённые. Вегетативное размножение происходит многосторонним почкованием. Может быть примитивный псевдомицелий, истинного мицелия нет. Колонии обычно пастообразные. На жидких средах при продолжительном культивировании может образовываться плёнка, но она не бывает сухой порошковидной или всплывающей.

Аски образуются преимущественно из вегетативных диплоидных клеток без непосредственно предшествующей конъюгации. Аскоспоры круглые или слабоовальные, бесцветные, гладкие, 1 – 4 в аске. Все виды активно сбраживают сахара и не используют нитраты. Лактозу и высшие парафины не ассимилируют.

Дрожжи этого рода с давних времен распространены в кустарном виноделии и широко используются в разных отраслях бродильной промышленности, в связи с чем они более других дрожжей изучены в разных аспектах. Их систематика, однако, постоянно пересматривается (Таблица 1). Центральный вид – *Saccharomyces cerevisiae* Hansen известен в десятках синонимов, которые в настоящее время рассматриваются как производственные расы, но не самостоятельные виды.

В разных определителях объём рода *Saccharomyces* сильно варьирует. Ван дер Вальт в определителе Лоддер различает 41 вид, среди которых есть диплоидные, гаплоидные и виды с соматогамной автогамией. В. И. Кудрявцев включает в род *Saccharomyces* только диплоидные дрожжи, выделяя гаплоидные виды в *Zygosaccharomyces*, а виды с автогамным половым процессом – в род *Debaryomyces*. Н. А. Красильников рассматривает виды, объединённые у Ван дер Вальта в *Saccharomyces*, в трёх родах – *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces* и *Torulaspora*. Такое деление на роды с изменениями в составе видов поддержано в новой систематике. Согласно Д. Ярроу, в роде *Saccharomyces* оставлено 5 видов с преимущественно диплоидной вегетативной фазой: *S. cerevisiae*, *S. kluyveri*, *S. exiguus*, *S. dairensis*, *S. servazzii*.

На сегодняшний день основным и наиболее доступным для воспроизведения критерием идентификации видов дрожжей в составе рода *Saccharomyces* следует признать совокупность их культурально-биохимических свойств, главным образом отношение к источникам углерода, подробно представленных в таблицах 2 и 3. Методы определения этих свойств изложены в настоящем руководстве в соответствующих разделах.

Таблица 1

Изменения в номенклатуре дрожжей
Saccharomyces
 (1952 – 1990)

По Lodder J. 1952	По Lodder J. 1970	По Kreger-van Rij. 1984	По Barnett J.A. 1990
<i>S. bayanus</i>	<i>S. bayanus</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. bayanus</i>
<i>S. pastorianus</i>			<i>S. pastorianus</i>
<i>S. oviformis</i>			<i>S. cerevisiae</i>
<i>S. cerevisiae</i>			
<i>S. ellipsoideus</i>			
<i>S. willianus</i>			
<i>S. carlsbergensis</i>			
<i>S. logos</i>	<i>S. uvarum</i>		
<i>S. uvarum</i>			
<i>S. chevalieri</i>			
<i>S. italicus</i>	<i>S. italicus</i>		
	<i>S. diastaticus</i>		
<i>S. delbruckii</i>	<i>S. delbruckii</i>	<i>Torulaspora delbruckii</i>	<i>Torulaspora delbruckii</i>
<i>S. fermentati</i>	<i>S. fermentati</i>	<i>Zygoaccharomyces balii</i>	<i>Zygoaccharomyces balii</i>
<i>S. rosei</i>	<i>S. rosei</i>		
	<i>S. vafer</i>		
<i>S. acidifaciens</i>	<i>S. balii</i>		
<i>S. balii</i>			
<i>S. fragilis</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>

Таблица 2

Видовая принадлежность дрожжей

Saccharomyces
(по Кудрявцеву)

Виды дрожжей рода <i>Saccharomyces</i> .	Отношение к источникам углерода.																				
	Сахара										Спирты					Органические кислоты					
	глюкоза	галактоза	сахароза	раффиноза	лактоза	мальтоза	декстрины	инулин	ксилоза	арабиноза	этанол	глицерин	маннит	дульцит	сорбит	уксусная	молочная	янтарная	яблочная	винная	лимонная
<i>S. vini</i>	+	+	+	1 / 3	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	+	+	+	1 / 3	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>S. uvarum</i>	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>S. carlsbergensis</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>S. chevalieri</i>	+	-	+	1 / 3	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>S. oviformis</i>	+	-	+	1 / 3	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>S. chodati</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-

+ — сбраживает, усваивает;
 - — не сбраживает, не усваивает;
 1/3 — степень сбраживания раффинозы.

Таблица 3

Видовая принадлежность дрожжей

Saccharomyces

(по Яроу)

Физиологические признаки	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. dairensis</i>	<i>S. exiguus</i>	<i>S. kluyveri</i>	<i>S. servazzii</i>	<i>S. telluris</i>	<i>S. unisporus</i>
Брожение							
глюкоза	+	+	+	+	+	+	+
галактоза	В	+	+	+	+	—	+
сахароза	В	—	+	+	—	—	—
мальтоза	В	—	—	— / СЛ	—	—	—
лактоза	—	—	—	—	—	—	—
Ассимиляция							
галактоза	В	+	+	+	+	—	—
сахароза	В	—	+	+	—	—	—
мальтоза	В	—	—	+	—	—	—
целлобиоза	—	—	—	В	—	—	—
трегалоза	В	В	+	+	+	—	—
лактоза	—	—	—	—	—	—	—
раффиноза	В	—	+	+	—	—	—
мелибиоза	В	—	—	+	—	—	—
D-ксилоза	—	—	—	— / М	—	—	—
арабиноза	—	—	—	—	—	—	—
рибоза	—	— / М	—	—	— / М	—	—
рамноза	—	—	—	—	—	—	—
растворимый крахмал	В	—	—	—	—	—	—
рибит	—	—	—	—	—	—	—
D-маннит	В	—	—	В	—	—	—
янтарная кислота	— / М	—	— / М	+	—	— / М	—
лимонная кислота	—	—	—	—	—	—	—
инозит	—	—	—	—	—	—	—
KNO ₃	—	—	—	—	—	—	—
лизин	—	—	—	+	—	—	+
этиламин-HCl	—	—	— / М	+	+	—	+
кадаверин-2HCl	—	—	—	+	+	—	+
Рост на среде:							
без витаминов	—	—	— / СЛ	В	—	—	—
с 50 % глюкозы	—	—	—	—	— / М	—	—
при 37°С	В	СЛ / —	—	+	В	+	+
Рост в присутствии циклогексимида							
100 мкг/мл	—	+	+	—	+	—	+
1000 мкг/мл	—	—	—	—	—	—	+
Среднее значение Г + Ц (mol %)	39,5	37,5	34,0	40,0	34,7	33,0	32,0

+ — признак всегда положительный;

В — признак варьирует;

М — ассимилирует;

— — не сбраживает и не ассимилирует вообще;

СЛ — слабо сбраживает или ассимилирует;

+/- — как правило, растут.

Морфология и вегетативное размножение.

Признаки, сгруппированные в этом разделе, разделяют на микро- и макроморфологические, поскольку первые изучают с помощью микроскопа, а вторые – визуально.

Микроморфология включает признаки, характеризующие отдельные вегетативные клетки (форма, размеры), а также способы вегетативного или бесполого размножения и образуемые при этом структуры.

Макроморфология объединяет культуральные признаки, характеризующие рост культуры на плотных (по штриху или в виде изолированных и гигантской колонии) или в жидких средах.

Характеристика вегетативных клеток.

Клетки дрожжей бывают круглые, овальные, яйцевидные, цилиндрические, треугольные, апикулятные (лимоновидные), колбовидные, стреловидные и серповидные. В некоторых случаях форма клетки бывает настолько характерна, что она может служить опознавательным признаком рода. Например, треугольные клетки образуются у *Trigonopsis*, серповидные – у *Selenotila*, грушевидные и колбовидные – у *Schizoblastosporion*, стреловидные – у *Brettanomyces*.

У дрожжей не со столь характерной формой клеток в качестве вспомогательных признаков можно использовать, например, такие, как образование капсул и внутрицитоплазматических включений, представляющих собой резервные вещества разного химического состава. Скапливаясь в больших количествах, они придают клеткам весьма характерный вид.

Капсулы на клетках дрожжей различаются как по размерам, так и по форме. Толщина их варьирует от едва заметного слоя, обнаруживаемого только под электронным микроскопом (микрокапсула), до размеров, превышающих в несколько раз диаметр самой клетки. Капсульный материал обычно равномерно покрывает клетку, как это бывает у круглых клеток; у штаммов с овальными клетками он более обилен по полюсам. Следует, однако, помнить, что такие признаки, как наличие капсулы или включений, в очень большой степени зависят от штамма, условий культивирования и возраста культуры. Поэтому они имеют в диагностической практике лишь второстепенное значение.

Размеры «взрослых» дрожжевых клеток варьируют у разных видов от 1,5 – 2,0 до 10 мкм по ширине и достигают 20 мкм и более в длину у продолговатых. Мелкими клетками характеризуются, например, виды *Pichia* и *Hansenula* со шляповидными спорами и апикулятные дрожжи родов *Hanseniaspora* и *Kloeckera*. Крупные клетки имеют сахаромикеты, липомикеты, дрожжи с лимоновидными клетками родов *Nadsonia*, *Saccharomycodes* и *Wickerhamia*.

Форму и размеры клеток описывают и определяют в культурах разного возраста на плотных и жидких средах.

1. Солодовое сусло концентрацией 8 – 10% СВ.
2. Сусло-агар: к среде 1 добавляют 2% агара.
3. Глюкозо-пептонная жидкая среда.
4. Глюкозо-пептонный агар.
5. Морфологический агар.

Синтетические среды имеют то преимущество перед сусловыми, что они стандартны по составу и дают более стабильные и потому сравнимые результаты. Поэтому для составления стандартного описания видов лучше пользоваться морфологическим агаром.

Первый просмотр и измерение производят в двух-трехсуточных культурах, выращенных при 25 – 30°C. В особых случаях, когда дрожжи растут очень медленно, первое описание делают позже – через одну-две недели инкубации. Затем культуры оставляют при комнатной температуре (17 – 18°C) и еще раз описывают через четыре недели.

При определении размеров измеряют микрометром длину и ширину не менее чем у 20 клеток и указывают крайние значения. Для измерения лучше использовать культуры на жидких средах.

Капсулы выявляют на клетках из молодых и старых культур с плотных сред. Препараты клеток (без фиксации) готовят методом негативного окрашивания черной тушью. Для этого петлю с культурой смешивают на предметном стекле с каплей туши и размазывают слегка краем покровного стекла, держа его под углом 45°, а затем накрывают этим стеклом. Тушь можно заготовить впрок. Ее разбавляют в два раза, центрифугируют, супернатант стерилизуют и хранят в запаянных ампулах. Хорошие результаты получаются с тушью, приготовленной по методу Литтмана.

Вегетативное размножение.

Дрожжи размножаются вегетативно путем почкования, деления или почкующегося деления.

При почковании на поверхности клетки образуется маленькое выпячивание – почка, которая увеличивается почти до размеров материнской клетки и отделяется от нее, оставляя на месте бывшего прикрепления почковый шрам или рубец в виде кольцеобразного выступа.

Если одновременно или последовательно образующиеся почки формируются на разных сторонах материнской клетки, то такое почкование называют множественным или многосторонним соответственно.

Почки могут закладываться и на широком основании, которое сужается к моменту отделения почки; иногда же, наоборот, почки образуются на узком и довольно заметном выросте. Для рода *Sterigmatomyces* характерен своеобразный процесс образования почек на длинных выростах, имитирующих стеригмы.

Полярное образование дочерних клеток, начинающееся с формирования почки на широком основании, и заканчивающееся появлением четко заметной даже в световом микроскопе септы в районе перешейка, носит название почкующегося деления.

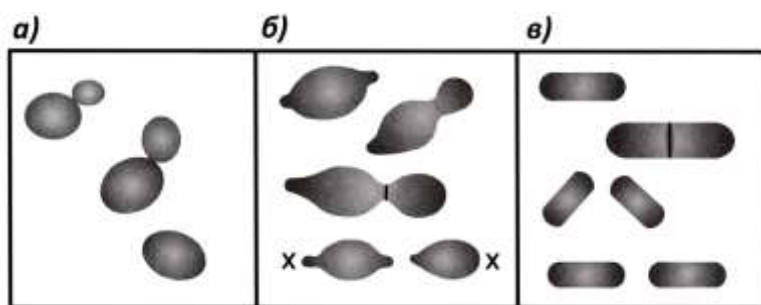


Рис. 1. Вегетативное размножение дрожжей.

а – мультилатеральное почкование (как у *Saccharomyces*);

б – биполярное почкование (как у *Hanseniaspora*). При следующей генерации две помеченные клетки будут образовывать почку с конца X;

в – бинарное деление (как у *Schizosaccharomyces*).

Если при почковании клетки не разъединяются, а продолжают образовывать все новые и новые почки, то, в конце концов, формируются структуры ложных гиф, из которых складывается псевдомицелий. Он бывает примитивным, если состоит из продолговатых клеток приблизительно одинакового размера, или же хорошо развитый, если дифференцируется на длинные клетки псевдогиф и окружающие их в характерном порядке (кучками, мутовками, поодиночке) клетки другой формы, именуемые бластоспорами.

Если дрожжи размножаются делением, то при образовании нитевидных структур они формируют истинный мицелий. При распаде такого мицелия на отдельные клетки последние носят название артроспор. На плотной среде они часто располагаются характерным зигзагом.

Эндоспоры – внутриклеточные бесполое споры – появляются в неопределенном числе в клетках гиф в старых культурах. Клетки при этом иногда заметно раздуваются.

Способы вегетативного размножения наблюдают одновременно с описанием микроморфологии дрожжей на тех же средах в культурах 2 – 3-суточного возраста.

Микроскоп и техника микроскопирования.

Микроскопы, дающие увеличение в сотни (световой) или тысячи раз (электронный), используют для изучения морфологии и строения микроорганизмов. Производственные микробиологические лаборатории снабжены световыми микроскопами различных типов отечественного и импортного производства. Преимущество за бинокулярными микроскопами с

автономной подсветкой и полным набором основных и дополнительных оптических систем.

Световой микроскоп.

Микроскоп состоит из механической и оптической частей (Рис. 2).

К механической части микроскопа относят *штатив*, который состоит из *подставки (башмак) 9*, придающей прибору устойчивость, и *тубусодержателя*.

К *тубусодержателю 12* прикреплены:

Тубус 14, имеющий у различных моделей современных микроскопов конструктивные отличия.

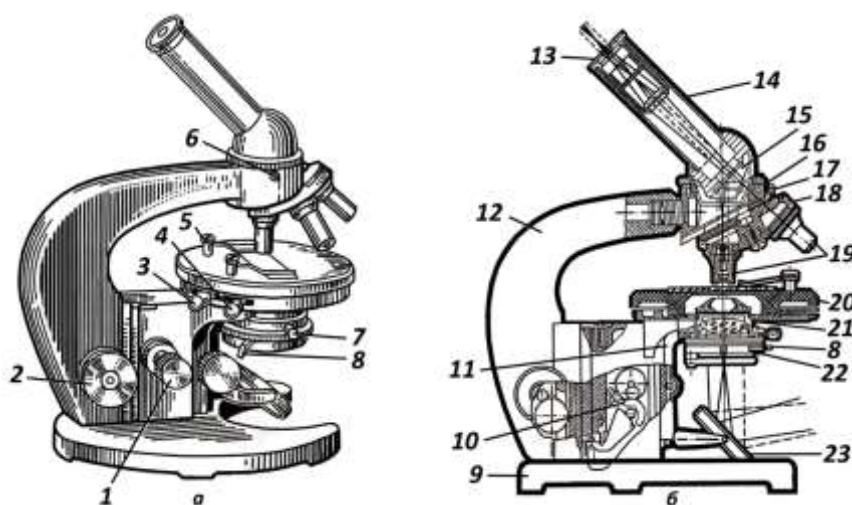


Рис. 2. *Общий вид (а) и схема (б) микроскопа:*

1 – микрометрический винт; 2 – макрометрический винт; 3 – стопорный винт; 4 – центрировочный винт для установки препарата; 5 – пружинные клеммы; 6 – винт для укрепления тубуса; 7 – стопорный винт конденсора; 8 – рукоятка перемещения диафрагмы; 9 – башмак микроскопа; 10 – коробка с микромеханизмом; 11 – кронштейн конденсора; 12 – тубусодержатель; 13 – окуляр; 14 – наклонный тубус; 15 – призма; 16 – головка тубусодержателя; 17 – винт для фиксации револьвера; 18 – револьвер на салазках; 19 – объективы; 20 – предметный столик; 21 – конденсор; 22 – апертурная диафрагма; 23 – зеркало.

В нижней части тубуса находится *револьверный механизм, 18* – вращающийся диск с гнездами для объективов, состоящий из двух пластин. Верхняя из них закреплена наглухо, а нижняя с отверстиями и резьбой для объективов свободно передвигается, причем центровка ввинченного в отверстие объектива фиксируется защелкивающейся пружинкой, попадающей в соответствующую прорезь.

Предметный столик 20, круглый или прямоугольный с отверстием в центре для прохождения света. Столик можно передвигать при помощи *винтов 4* в двух взаимно перпендикулярных направлениях. Для закрепления препарата на столике имеются специальные *зажимы 5* разной конструкции.

Механизм для передвижения тубуса вверх-вниз состоит из двух основных узлов – макро- *2* и микрометрического *1* винтов.

Макрометрический винт (кремальера) служит для быстрого поднятия и опускания тубуса при грубой настройке. Один оборот зубчатого колеса позволяет перемещать тубус на 20 мм вверх или вниз.

Микрометрический винт предназначен для передвижения тубуса при тонкой настройке и просматривания препарата в глубину. Полный оборот ведущего колесика продвигает тубус на 0,1 мм. Барабан винта разделен на 50 делений, каждое деление равно 0,002 мм.

Оптическая часть микроскопа состоит из осветительного устройства, окуляров и объективов.

Осветительное устройство состоит из конденсора, ирис-диафрагмы и осветителя (или плосковогнутого зеркала).

Конденсор 21 применяют для концентрирования отраженных зеркалом лучей света, фокус которых должен находиться в плоскости препарата. Он состоит из двух линз, заключенных вместе с ирис-диафрагмой в общую цилиндрическую оправу. Верхняя линза в конденсоре плосковыпуклая, нижняя – двояковыпуклая. Весь конденсор можно передвигать вверх и вниз при помощи особого винта. При поднятии и опускании конденсора меняется угол сходимости лучей, в результате меняется и интенсивность освещения: при поднятом конденсоре – освещение ярче, при опущенном – слабее.

Под конденсором помещена *апертурная (ирисовая) диафрагма 22*. Ирис-диафрагма состоит из нескольких подвижных сегментов, сдвигаемых и раздвигаемых при помощи *рычажка 8*. Диафрагма установлена перед нижней линзой конденсора и позволяет также регулировать освещение. Изменяя диаметр отверстия, через которое проходит пучок света, регулируют интенсивность освещения поля зрения.

Если апертура конденсора меньше апертуры рабочего объектива, то из-за слабого потока света возможности линзы объектива задействованы не полностью. Если апертура конденсора больше апертуры рабочего объектива, что характерно для объективов малого увеличения, то уменьшают диаметр отверстия ирисовой диафрагмы конденсора.

Зеркало 23 подвижно закреплено под конденсором на особом рычажке, при помощи которого оно может быть установлено в любой плоскости. Одна его поверхность плоская, другая – вогнутая. При работе с конденсором используют плоскую, без конденсора – вогнутую поверхность зеркала. При дневном свете пользуются плоской стороной зеркала, при искусственном свете – вогнутой.

При микроскопировании существенное значение имеет освещение исследуемого объекта. Освещение чаще устанавливают по методу Келлера.

1. Осветитель (при работе с зеркалом желательно использовать стандартные осветители ОИ-7 и ОИ-19, содержащие микролампу с небольшой плотно скрученной спиралью, которую можно передвигать вдоль оси осветителя) располагают на расстоянии 30...40 см от микроскопа.
2. На предметный столик ставят препарат, в рабочее положение переводят объектив 8[×].
3. Конденсор поднимают до упора, полностью открывают ирисовую диафрагму.
4. Зеркало устанавливают плоской поверхностью и почти полностью закрывают диафрагму осветителя.
5. На зеркало помещают лист белой бумаги и, передвигая патрон осветителя, добиваются четкого изображения на бумаге нити накала лампы.
6. Глядя в окуляр, при помощи зеркала получают в центре поля зрения изображение краев диафрагмы осветителя – светлое пятно с нерезко очерченными краями.
7. Используя объектив 8[×], фокусируют объект в области светлого пятна.
8. Опуская конденсор, в плоскости препарата фокусируют изображение краев диафрагмы осветителя и движением зеркала переводят светлое пятно в центр поля зрения.
9. Диафрагму осветителя открывают до тех пор, пока светлое пятно не закроет все поле зрения.
10. В дальнейшем положение зеркала, конденсора и диафрагмы осветителя больше не меняют.

При работе со встроенными стационарными осветителями правила настройки подробно изложены в инструкциях по эксплуатации микроскопов.

Окуляр 13 вставляют в верхнюю часть тубуса. Увеличенное объективом изображение дополнительно увеличивается окуляром, но новых деталей структуры при этом не наблюдается. Обычно окуляр состоит из двух плосковыпуклых линз – глазной и собирательной – обращенных своими выпуклыми поверхностями вниз к объективу. Линзы заключены в общую металлическую трубку, между линзами находится диафрагма поля зрения микроскопа. У современных биологических микроскопов имеются окуляры с увеличениями в 7, 8, 10 и 15 раз. Размер увеличения указан на верхней оправе.

Объектив – основная часть оптической системы микроскопа, дающая увеличенное изображение предмета. Объектив состоит из нескольких линз, помещенных в металлическую трубку и закрепленных канадским бальзамом. На верхней части трубки имеется резьба, при помощи которой объектив ввинчивается в гнездо револьверной пластинки. Самая нижняя плосковыпуклая линза объектива, обращенная к предмету, называется фронтальной; именно она позволяет получать увеличение, а остальные

линзы только устраняют оптические недостатки изображения (сферическую и хроматическую абберацию); чем больше кривизна фронтальной линзы и меньше ее размеры, тем большее увеличение предмета дает объектив. Изображение предмета обратное.

Современные биологические микроскопы обычно снабжены объективами с увеличением в 8, 10, 20, 40, 60 и 90 раз. Эти цифры указаны на объективе. При работе с объективами, увеличивающими в 60, 90 и более раз, фронтальная линза погружается в жидкость.

Важно получить не только увеличенное, но и четкое изображение исследуемого объекта.

Четкость изображения зависит от разрешающей способности микроскопа, которую понимают как минимальное расстояние между двумя точками, при котором они видны раздельно. Разрешающая способность микроскопа зависит от числовой апертуры и длины волны используемого света.

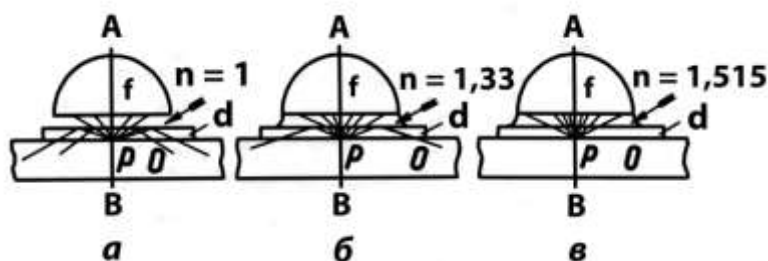


Рис. 3. *Ход лучей в сухом (а), водно- (б) и масляно-иммерсионном (в) объективе:*

- n* – показатель преломления;
- РО* – препарат;
- f* – фронтальная линза объектива;
- d* – покровное стекло.

Повысить разрешающую способность микроскопа можно за счет применения более коротких лучей света или, что более доступно, за счет приближения показателя преломления среды, граничащей с линзой, к аналогичному показателю стекла. С этой целью прослойку воздуха между линзой объектива и предметным стеклом замещают специальной жидкостью с показателем преломления, близким к показателю преломления стекла. Особенно это необходимо при использовании объективов большого увеличения ($60\times$, $90\times$) с фронтальными линзами малой площади. Показатель преломления стекла и воздуха составляет соответственно 1,52 и 1,0, поэтому в качестве иммерсионных жидкостей, создающих оптически однородную среду между предметным стеклом и линзой объектива, применяют чаще всего кедровое масло ($n = 1,5$), глицерин ($n = 1,4$), воду ($n = 1,3$). Ход лучей света при использовании обычного сухого и иммерсионного объективов показан на рисунке 3.

Объективы для масляной иммерсии обозначают «МИ», водной – «ВИ».

Общее увеличение, даваемое системой объектива и окуляра, равно произведению увеличений окуляра и объектива.

Например, при окуляре $15\times$ и объективе $40\times$ увеличение будет: $15 \times 40 = 600$ раз.

При работе с сильными объективами толщина покровного стекла не должна превышать 0,15 – 0,18 мм ввиду малого рабочего расстояния.

Под рабочим расстоянием объектива понимают расстояние от плоскости фронтальной линзы до изучаемого объекта при нахождении последнего в фокусе. Чем больше увеличение объектива, тем меньше рабочее расстояние и поле зрения.

На корпусе объектива обозначена его увеличивающая способность ($8\times$, $20\times$, $40\times$, $90\times$) и числовая апертура.

Числовая апертура A отражает количество света (Рис. 4), попадающего в линзу.

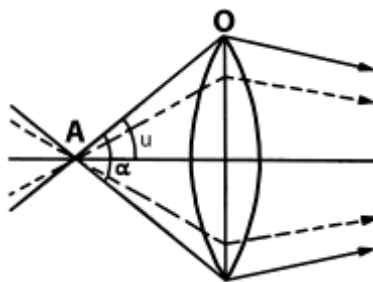


Рис. 4. *Схема хода лучей при разном значении угла α :*

А – объект;

О – объектив;

u – половина отверстиеного угла.

Величина ее определяется по формуле:

$$A = n \sin u,$$

где

A – числовая апертура линзы;

n – показатель преломления среды, граничащей с линзой;

u — половина отверстиеного угла α .

Микроскопы необходимо хранить под чехлами или колпаками для защиты от пыли. Удобно пользоваться чехлами из полиэтилена; не следует оставлять микроскоп под солнечными лучами или в теплом месте, так как может размягчиться клей, которым склеены линзы.

В комнате, где установлен микроскоп, не должно быть паров кислот и водяных паров. При переносе микроскоп следует брать только за тубусодержатель и следить за тем, чтобы окуляр не выпал из тубуса.

Для наружной очистки оптики применяют смоченные спиртом мягкие ткани, лучше фланель, не оставляющие после себя волокон. Использование ксилола и бензина для этих целей может привести к расклеиванию линз.

Дополнительные оптические системы.

Фазово-контрастное устройство.

Устройство включает в себя: а) фазовую пластинку – расположенный в задней фокальной плоскости объектива прозрачный диск, на поверхность которого напылено кольцо из металлов (фазовое кольцо); б) кольцевую диафрагму – помещенную под конденсором светонепроницаемую пластину с прозрачным кольцевидным участком.

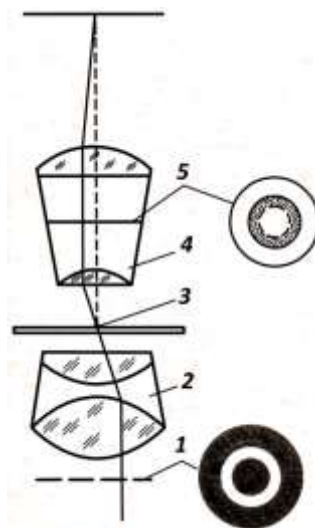


Рис. 5. *Схема хода лучей при использовании фазово-контрастного устройства:*
1 – кольцевая диафрагма; 2 – конденсор; 3 – объект;
4 – объектив; 5 – фазовая пластинка.

Световая волна при прохождении через живую клетку отстает по фазе приблизительно на $1/4$ длины волны и дополнительно сдвигается еще на $1/4$ после прохождения через фазовую пластинку. Ход лучей в фазово-контрастном устройстве показан на рисунке 5. Сдвинутые по фазе после прохождения через фазовую пластинку лучи либо совпадают и складываются с прямыми лучами, идущими мимо объекта, либо оказываются в противофазе. В первом случае исследуемый объект виден как светлый на темном фоне, а во втором – как темный на светлом фоне.

В микробиологии широко применяют фазово-контрастное устройство КФ-4 (Рис. 6) (объект виден темным на светлом фоне). Последовательность перехода к работе с фазово-контрастным устройством следующая.

1. Обычный конденсор заменяют на фазово-контрастный, а объектив $40\times$ – на аналогичный фазовый объектив.
2. Диск револьвера конденсора поворачивают до появления в окошечке цифры 0; диафрагму конденсора полностью открывают.
3. Используя объектив $8\times$, устанавливают освещение по Келлеру.

4. Обычный окуляр заменяют на вспомогательный и с помощью тубуса добиваются четкого изображения фазовой пластинки в виде темного кольца.
5. Устанавливают кольцевую диафрагму, соответствующую объективу $40\times$. В этом случае наряду с темным кольцом фазовой пластинки можно видеть светлое кольцо диафрагмы.
6. При помощи центрировочных винтов совмещают фазовое кольцо и кольцо диафрагмы.
7. Вспомогательный окуляр заменяют обычным и микроскопируют препарат.

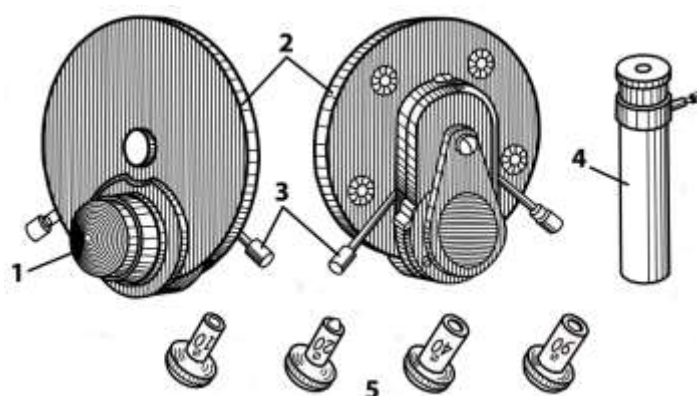


Рис. 6. Фазово-контрастное устройство КФ-4:

1 – конденсор; 2 – револьверный диск с набором кольцевых диафрагм; 3 – центрировочные винты; 4 – вспомогательный окуляр; 5 – набор фазовых объективов.

При работе с другими объективами устанавливают соответствующие диафрагмы.

Темнопольный конденсор.

При темнопольной микроскопии используют специальный конденсор с затемненной центральной частью, поэтому в плоскость объекта идут только боковые лучи, отраженные от внутренних зеркальных поверхностей конденсора. Лучи направлены под таким углом, что не попадают в линзу объектива и поэтому поле зрения выглядит темным (Рис. 7). Та часть лучей, которая попадает на объект, отражается в линзу объектива, что позволяет видеть светлое изображение объекта на темном фоне.

Чтобы перейти к методу темнопольной микроскопии, поступают следующим образом.

1. Вынимают окуляр, светлопольный конденсор и вывинчивают один из объективов ($8\times$).
2. Прикрывают диафрагму осветителя и фокусируют нить накала

лампы на листе белой бумаги, помещенном на зеркале (*Установка освещения по Келлеру*).

3. Раскрывают диафрагму осветителя, закрывают матовым стеклом конец тубуса и с помощью зеркала добиваются равномерного освещения поля зрения.
4. Ставят на место окуляр, объектив $8\times$, темнопольный конденсор, положение зеркала при этом не меняют.
5. На линзу конденсора наносят каплю дистиллированной воды, на столик помещают препарат «раздавленная капля» таким образом, чтобы вода на линзе конденсора контактировала с нижней поверхностью предметного стекла.
6. Глядя в окуляр, при помощи центрировочных винтов переводят в центр поля зрения светлое кольцо с темным пятном в центре. Далее регулируют видимость объекта в поле зрения.

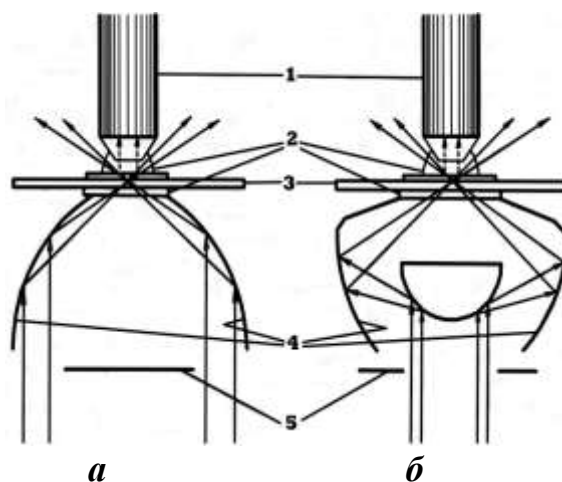


Рис. 7. Ход лучей в темнопольных конденсорах:
а – параболоид-конденсор;
б – кардиод-конденсор;
1 – объектив; *2* – иммерсионное масло; *3* – препарат;
4 – зеркальная поверхность; *5* – диафрагма.

Микроскопия.

Приступая к работе с микроскопом, проверяют состояние конденсора: он должен быть поднят до уровня предметного столика, диафрагма открыта. Приподняв тубус микроскопа, устанавливают объектив с наименьшим увеличением ($8\times$, $10\times$); глядя в окуляр, при помощи зеркала добиваются полного освещения поля зрения. Затем на исследуемый препарат наносят каплю кедрового масла (или его заменителя), помещают препарат на предметный столик, поворотом револьвера устанавливают иммерсионный объектив. (Чтобы избежать соприкосновения объектива со столиком, тубус следует держать приподнятым.) Под контролем глаза (смотреть сбоку)

фронтальную линзу объектива легким поворотом макрометрического винта погружают в каплю иммерсионного масла и, наблюдая в окуляр, осторожно поднимают тубус до видимости препарата. Затем легкими поворотами микрометрического винта (вперед-назад) регулируют четкость изображения.

При смене препарата тубус микроскопа поднимают, препарат снимают с предметного столика и, если исследование проводилось с иммерсионной системой, фронтальную линзу объектива тщательно очищают от масла, протерев салфеткой, смоченной спиртом.

В конце работы тубус приподнимают макровинтом, револьвер переводят в нейтральное положение, масло с линзы осторожно снимают мягкой хлопчатобумажной тканью. Микроскоп убирают в деревянный футляр или накрывают стеклянным колпаком (лучше из цветного стекла) для защиты от света.

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

Приготовленные препараты «раздавленная капля» и «висячая капля» просматривают с объективами $20\times$ или $40\times$.

Фиксированные окрашенные препараты микроскопируют вначале с объективом $40\times$, потом – с объективом $90\times$. 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.

Методы исследования микроорганизмов в светлпольном микроскопе.

Микроскопическое исследование микроорганизмов проводят в живых или фиксированных окрашенных препаратах.

Приготовление препаратов.

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.

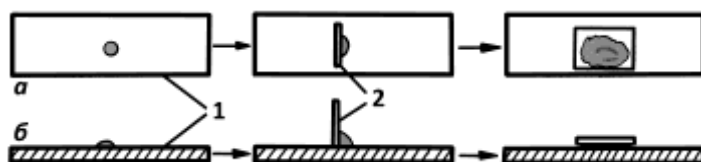


Рис. 8. Схема приготовления препарата «раздавленная капля»:

а — вид сверху;

б — вид сбоку;

1 — предметное стекло; 2 — покровное стекло.

Затем, 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 4 – 5 см³ 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. 8).

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.

«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. 9). 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.

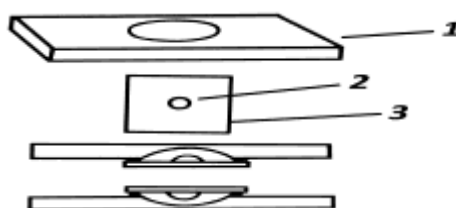


Рис. 9. Схема приготовления препарата «висячая капля»:

1 – предметное стекло с лункой; 2 – капля; 3 – покровное стекло.

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

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 жара 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 Карнуа:

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-формолин:

Этиловый спирт, 96 °	– 95 см ³
Формалин	– 5 см ³

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 основным, кислым или нейтральным 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 в 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 провести 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 или кристаллизатора.

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.

Определение размеров клеток микроорганизмов.

Клетки микроорганизмов измеряют под микроскопом с помощью окулярной линейки-микрометра или окулярного винтового микрометра. Для измерения лучше использовать живые, а не фиксированные клетки, так как фиксация и окраска приводят к некоторому изменению истинных размеров клеток. Размеры клетки удобно определять с помощью фазово-контрастного устройства. Если клетки подвижны, препарат слегка подогревают или к капле исследуемой суспензии добавляют каплю 0,1%-го водного раствора агара. Размеры клеток выражают в микрометрах.

Объективный микрометр (объект-микрометр) – это металлическая пластинка с отверстием в центре. В отверстие вставлено стекло, на которое нанесена линейка длиной 1 мм (Рис. 10).



Рис. 10. Объективный микрометр (вид под микроскопом).

Она разделена на 100 частей, т. е. деление объективного микрометра соответствует 0,01 мм, или 10 мкм. Для определения цены деления окулярного микрометра объективный микрометр помещают на столик микроскопа и фокусируют при малом увеличении. Изображение линейки перемещают в центр поля зрения и только после этого меняют объектив на тот, при котором будут определяться размеры клеток. Перемещая столик микроскопа, и поворачивая окуляр, устанавливают микрометры так, чтобы их шкалы были параллельны, и одна перекрывала другую. Цену деления окулярного микрометра определяют по принципу нониуса, т.е. совмещают одно из делений шкалы окулярного и объективного микрометров и находят следующее их совмещение (Рис. 11). Устанавливают, скольким делениям объективного микрометра соответствует одно деление окулярного микрометра.

Например, 2 деления объект-микрометра (20 мкм) соответствуют 5 делениям окуляр-микрометра. Следовательно, одно деление окуляр-микрометра равно 4 мкм (20:5).

Если теперь на столик микроскопа поместить препарат с клетками микроорганизмов и рассматривать его при том же увеличении, то можно

измерить величину клетки. Для этого определяют, какому числу делений окулярной линейки соответствует величина измеряемого объекта, и умножают это число на цену деления окулярного микрометра.

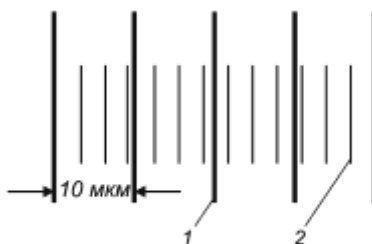


Рис. 11. Совмещение измерительных линеек в микроскопе (принцип нониуса).
1 – шкала объект-микрометра; 2 – шкала окуляр-микрометра.

Окулярный микрометр (окуляр-микрометр) представляет собой круглую стеклянную пластинку (Рис. 12), в центре которой выгравирована линейка длиной 5 мм. Линейка разделена на 50 частей. Окулярный микрометр вставляют в окуляр. Для этого вывинчивают глазную линзу окуляра, помещают на его диафрагму окулярный микрометр делениями вниз и закручивают линзу.

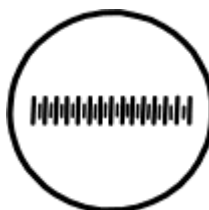


Рис. 12. Окулярный микрометр (в окуляре микроскопа).

Однако только с помощью окуляр-микрометра нельзя непосредственно измерить величину клетки, так как последние рассматриваются через объектив и окуляр, а деления линейки – только через верхнюю линзу окуляра. Поэтому, прежде чем приступить к измерению величины клеток, необходимо определить цену деления окулярного микрометра для данного увеличения микроскопа. Это делают с помощью объективного микрометра.

Винтовой окулярный микрометр (Рис. 13) закрепляют на тубусе микроскопа, предварительно вынув окуляр. В окуляре винтового микрометра имеется неподвижная шкала с ценой деления 1 мм для определения размеров крупных объектов и подвижная стеклянная пластинка с перекрестием. Пластинка связана с микрометрическим винтом-барabanом и перемещается вместе с перекрестием при его вращении. Для измерения длины клетки вращением микрометрического винта-барабана окулярного микрометра подводят перекрестие к концу клетки и отмечают деление на барабане. Затем, вращая барабан, перемещают перекрестие до другого конца клетки и вновь отмечают деление на барабане. Определяют, скольким делениям микрометрического винта-барабана соответствует длина клетки, и умножают

полученное значение на цену деления барабана при данном увеличении микроскопа.

Цену деления барабана для каждого объектива определяют с помощью объект-микрометра. С этой целью подводят перекрестие к началу одного деления объективного микрометра и отмечают деление на барабане. Затем, вращая барабан, перемещают перекрестие до конца деления объективного микрометра и вновь отмечают деление на барабане. Определяют, скольким делениям микрометрического винта-барабана соответствует одно деление объективного микрометра.

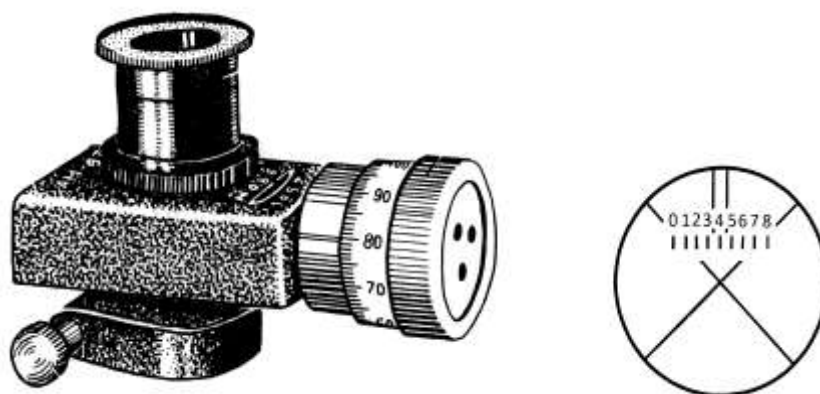


Рис. 13. Винтовой окулярный микrometer.

Например, одно деление объективного микрометра, т.е. 10 мкм, соответствует X делениям микрометрического винта-барабана; следовательно, одно деление его при данном увеличении микроскопа равно $10 : X$ (мкм).

Для получения достоверных результатов необходимо измерить не менее 20 – 30 клеток. При определении размеров клеток округлых форм измеряют их диаметр, у клеток других форм – длину и ширину; указывают средние размеры клеток и пределы колебаний, т.е. минимальные и максимальные размеры.

Методы окраски микроорганизмов и цитохимические методы исследования дрожжей.

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.

Окраска спор дрожжей.

Метод Виртца.

Фиксированный на пламени препарат заливают 5 %-ным водным раствором малахитового зеленого и 3 – 4 раза прогревают до появления паров (30 – 60 с). Окраску можно проводить, выдерживая препарат 3 – 5 минут в растворе малахитового зеленого, подогретого до 80°C. Затем препарат промывают 30 секунд в проточной воде и докрашивают 30 секунд 0,5%-ным водным раствором сафранина.

Зрелые аскоспоры окрашиваются в сине-зеленый, а вегетативные клетки – в красный цвета.

Аскоспоры дрожжей родов *Hansenula*, *Schizosaccharomyces* могут удерживать оба красителя.

Карбол-фуксиновая окраска.

Вар. 1.

Фиксированный на пламени препарат заливают раствором Циля (10 см³ насыщенного спиртового раствора основного фуксина с 90 см³ 5 %-ого фенола) и нагревают 2 – 5 мин до появления паров. Затем проводят обесцвечивание препарата, погружая его в 2 %-ный раствор молочной кислоты или в 95 %-ный этанол, содержащий 1 мл концентрированной HCl в 100 см³. Препарат промывают в воде и докрашивают 3 – 5 минут 1 %-ными растворами метиленового синего или нильского голубого.

Зрелые аскоспоры окрашиваются в красный, вегетативные клетки – в синий цвета.

Аскоспоры рода *Schizosaccharomyces*, а также после набухания аскоспоры дрожжей родов *Hansenula* и *Pichia* не обладают кислотоустойчивостью и окрашиваются в синий цвет.

Вар. 2.

Фиксированный препарат окрашивают в течение 2 – 3 мин карболовым фуксином при подогревании над пламенем горелки, затем краску сливают и препарат обесцвечивают соляной кислотой со спиртом (две части 10 %-ого раствора соляной кислоты и одна часть 96 %-ого спирта) в течение 30 секунд, промывают водой и окрашивают в течение 1 – 2 минут метиленовой синью.

Споры окрашиваются в красный цвет, а вегетативные клетки – в синий.

Определение гликогена в клетках дрожжей.

Гликоген – одно из резервных веществ дрожжевых клеток. Он накапливается в цитоплазме и окрашивается раствором Люголя в коричневый или красно-бурый цвет. Наблюдения за содержанием гликогена в клетках дрожжей проводят в динамике развития культуры.

Готовят препарат "раздавленная капля" в растворе Люголя и в нескольких полях зрения подсчитывают общее количество клеток и количество клеток, содержащих гликоген. Общее число подсчитанных клеток должно быть не менее 100.

Полученные данные можно регистрировать в предлагаемой таблице 4.

Таблица 4

Содержание гликогена в клетках

<i>Время брожения, ч</i>	<i>Число клеток</i>		<i>% клеток с гликогеном</i>
	<i>всего</i>	<i>с гликогеном</i>	
0			
5			
24			
48			
72			

Если препарат нагреть до 60°C, окраска гликогена исчезает, а при охлаждении препарата она вновь восстанавливается.

Окраска волютина.

По методу Омелянского.

На предметном стекле готовят тонкий мазок из культуры исследуемых дрожжей, высушивают на воздухе и фиксируют на пламени горелки. Мазок окрашивают карболовым фуксином 30 – 40 секунд и промывают водой. Далее мазок дифференцируют, погружая его в склянку с 1 %-ным раствором серной кислоты на 20 – 30 секунд и немедленно промывают водой. Серная кислота обесцвечивает цитоплазму, а зерна волютина остаются окрашенными фуксином. Препарат докрашивают метиленовым синим (1 : 40) 20 – 30 секунд, промывают водой, высушивают на воздухе и микроскопируют, пользуясь объективом МИ-90.

На препарате зерна волютина окрашены в красный цвет, цитоплазма клетки – в голубой.

По методу Леффлера.

Тонкий фиксированный мазок культуры исследуемых дрожжей окрашивают метиленовым синим Леффлера в течение 3 мин. Мазок промывают водой, не высушивая, покрывают его покровным стеклом и микроскопируют, пользуясь объективом ВИ-60.

На препарате зерна волютина окрашены в красновато-фиолетовый цвет, цитоплазма – в голубой.

Для более ясной дифференциации зерен волютина под покровное стекло полоской фильтровальной бумаги протягивают каплю 1 %-ого раствора серной кислоты. При этом зерна волютина сохраняют окраску, а цитоплазма обесцвечивается.

Обратный результат можно получить, добавляя под покровное стекло каплю 5 %-ого раствора соды. Волютиновые зерна обесцвечиваются, а цитоплазма клетки сохраняет голубой цвет.

Окраска микроорганизмов по Граму.

Препарат, фиксированный в пламени горелки или обработанный метиловым спиртом, покрывают раствором генцианвиолета на 1 – 2 мин, затем обрабатывают в течение 1 – 2 мин раствором Люголя, промывают водой и быстро опускают в 96 %-ный этиловый спирт. В спирте препарат держат до тех пор, пока от него не перестанет отходить краска. После этого препарат вновь промывают водой и окрашивают разбавленным фуксином Пфейфера в течение 0,5 – 1 мин.

Грамположительные бактерии окрашиваются в темно-фиолетовый цвет, грамотрицательные – в красный.

Метод применяется исключительно для окраски бактерий и не эффективен при окрашивании дрожжей, ввиду принципиальных отличий в строении клеточной стенки.

Краски.

Метиленовый синий (насыщенный спиртовой раствор).

К 100 см³ 96 %-ого этилового спирта прибавляют 10 г метиленового синего (в порошке) и оставляют стоять несколько дней (при этом несколько раз встряхивают), затем раствор фильтруют.

Метиленовый синий 1:40.

Метиленовый синий (насыщенный спиртовой раствор)	– 1 см ³
Вода дистиллированная	– 40 см ³

Метиленовый синий щелочной (синька Леффлера).

В 100 см³ дистиллированной воды растворяют 30 см³ насыщенного спиртового раствора метиленового синего и 1 см³ 1 %-ого раствора едкого кали.

Разбавленная синька (по Финку).

Готовят три раствора:

0,09 г фосфорнокислого натрия (N₂HPO₄) растворяют в 500 см³ дистиллированной воды;

13,6 г фосфорнокислого калия (KH₂PO₄) растворяют в 500 см³ дистиллированной воды;

0,1 г метиленового синего растворяют в 500 см³ дистиллированной воды.

Для приготовления рабочего раствора синьки смешивают 0,25 см³ первого раствора с 99,75 см³ второго и 100 см³ раствора синьки, рН раствора должно быть 4,6.

Основной фуксин.

2 г сухой краски и 20 см³ 96 %-ого этилового спирта встряхивают и оставляют стоять несколько дней, получается насыщенный спиртовой раствор.

Карболовый фуксин (по Цилю).

10 см³ насыщенного спиртового раствора основного фуксина растворяют в 100 см³ 5 %-ого раствора карболовой кислоты (фенола).

Разбавленный фуксин (по Пфейферу).

Для окраски микроорганизмов применяют раствор разбавленного в 10 раз карболового фуксина.

Малахитовый зеленый (водный насыщенный раствор).

Малахитовый зеленый	— 5 г
Дистиллированная вода	— 100 см ³

Для окраски спор лучше брать спиртово-водный раствор

Малахитовый зеленый	— 5 г
Спирт этиловый, 96 °	— 20 см ³
Дистиллированная вода	— 80 см ³

Сафранин (водный раствор).

2,5%-ный раствор сафранина в 96%-ном этаноле	— 10 см ³
Вода дистиллированная	— 100 см ³

Насыщенный спиртовой раствор генцианвиолета (для окраски по Граму).

1 г сухой краски растворяют в 10 см³ 96 %-ого спирта и смешивают со 100 см³ 5 %-ого раствора карболовой кислоты; для достижения прозрачности добавляют несколько капель спирта.

Растворы йода в йодистом калии (по Люголю).

Раствор Люголя для окраски по Граму.

Для приготовления раствора Люголя 1 г кристаллического йода растирают в фарфоровой ступке с 2 г йодида калия и порциями (по 5 см³) добавляют дистиллированную воду до полного растворения кристаллического йода в йодиде калия. После полного растворения кристаллов объем доводят до 300 см³.

Приготовленный раствор Люголя хранят в посуде из темного стекла (на свету раствор Люголя быстро обесцвечивается).

Раствор Люголя для выявления гранулезы.

Кристаллический йод	– 1 г
Йодид калия	– 2 г
Дистиллированная вода	– 100 см ³

Гранулеза в клетках окрашивается в темно-синий цвет.

Раствор Люголя для выявления гликогена.

Кристаллический йод	– 7 г
Йодид калия	– 20 г
Дистиллированная вода	– 100 см ³

Гликоген приобретает красно-бурую окраску.

Техника приготовления растворов для выявления гранулезы и гликогена такая же, как раствора Люголя для окраски по Граму.

Раствор туши.

Традиционный метод.

Жидкая натуральная тушь	– 10 см ³
Дистиллированная вода	– 90 см ³

Раствор центрифугируют 15 – 20 мин. Верхний слой отсасывают (пипеткой), переносят в пробирку и автоклавируют 30 мин при 0,05 МПа (температура 110°C).

Можно раствор туши сразу после смешивания автоклавировать 30 мин при давлении 0,05 МПа. После автоклавирования раствор отстаивают две недели, после чего его можно использовать.

Метод Литтмана.

Черная тушь	– 15 см ³
Раствор тимерсола в соотношении 1 : 1000	– 30 см ³
Твин-80	– 0,1 см ³

На черном фоне капсулы видны как светлый ореол вокруг клетки.

Методы стерилизации посуды и питательных сред.

Основываясь на влиянии внешних условий на микроорганизмы, в микробиологической практике разработан ряд приемов, приводящих микроорганизмы к гибели. Одним из таких приемов является стерилизация.

Под стерилизацией (обеспложиванием) понимают полное уничтожение микроорганизмов и их спор в питательных средах, посуде, на инструментах и других предметах лабораторного оборудования. Для их стерильности наиболее часто пользуются воздействием высокой температуры.

Стерилизация обжиганием на пламени горелки.

Небольшие стеклянные (палочка, шпатель) и металлические (игла, петля, пинцет, скальпель) предметы проводят несколько раз через пламя горелки. Стерилизация достигается обугливанием находящихся на их поверхности микроорганизмов. Обжиганием на пламени пользуются и для стерилизации поверхности ватных пробок.

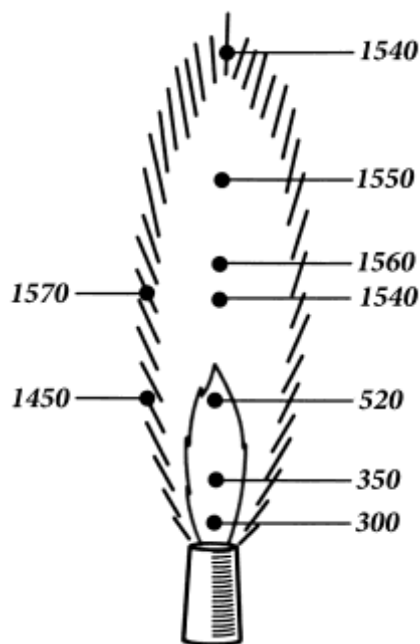


Рис. 14. *Значение температуры в разных участках пламени газовой горелки.*

Стерилизация кипячением.

Стерилизацию металлических инструментов и резиновых трубок проводят кипячением. Так как споры некоторых бактерий сохраняют жизнеспособность при кипячении в воде в течение нескольких часов, то рекомендуется стерилизацию кипячением проводить в 2 %-ном растворе карбоната натрия в течение 10 мин. В этих условиях споры погибают.

Стерилизация сухим жаром.

Сухим жаром стерилизуют стеклянную посуду. При этом пробирки, колбы предварительно закрывают ватными пробками. Чтобы избежать заражения простерилизованных предметов из воздуха, их перед стерилизацией заворачивают в оберточную бумагу и вынимают только перед работой.

Пипетки перед стерилизацией с концов закрывают ватой. Затем их обертывают длинными полосками бумаги шириной 3,5 – 4 см. Бумагу наматывают по спирали, начиная с конца пипетки, который будет погружен в среду. Концы обертки закрепляют ниткой. Тонкие пипетки обертывают бумагой вместе по несколько штук.

Чашки Петри заворачивают в бумагу в форме квадрата, сторона которого приблизительно равна трем диаметрам чашки. Чашку Петри помещают на середину листа, загибают его с двух противоположных сторон кверху так, чтобы края налегали друг на друга. Два свободных конца загибают вниз. При таком обертывании у чашек легко различать верх и низ.

Подготовленную таким образом посуду помещают в сушильный шкаф, в котором нагревают ее при температуре 160 – 170°C в течение 2 ч (с момента установления нужной температуры). При таком нагревании погибают не только бактерии, но и их споры.

Температуру в сушильном шкафу выше 175°C допускать не следует, так как при этом ватные пробки буреют, а бумажная обертка становится ломкой.

Стерилизация текучим паром – дробная стерилизация или тиндализация.

Питательные среды, воду, резиновые трубки и другие предметы, портящиеся от действия сухого жара, и питательные среды, портящиеся под действием высокой температуры (среды, содержащие молоко, солод, желатину), обеспложивают действием текучего пара.

Стерилизацию текучим паром производят в кипятильнике Коха или в автоклаве с открытым вентилем. Воду в них доводят до кипения, и образующийся пар обтекает стерилизуемые объекты. Температура стерилизуемых питательных сред достигает 100°C. Нагревание в течение 30 – 45 мин приводит к гибели вегетативных клеток бактерий, но споры их не погибают. Затем жидкость охлаждают до температуры, благоприятной для прорастания спор (до 30°C). Нагревание приводит к активации спор и более быстрому их прорастанию. На следующий день нагревание повторяют. При этом погибают вегетативные клетки, развившиеся из спор. Для обеспечения полной стерильности жидкость оставляют еще на сутки и снова повторяют нагревание. Такую стерилизацию называют дробной или тиндализацией.

Пастеризация.

В основе пастеризации лежит нагревание жидкостей до температуры меньше 100°C. Целью ее является уничтожение неспорозоных бактерий в жидкостях, теряющих питательные свойства при кипячении (молоко, пиво, вино и др.). Осуществляется пастеризация путем нагревания жидкостей при 60°C в течение 30 мин, или при 75°C в течение 15 мин, или при 80°C в течение 10 мин.

Холодная стерилизация.

Органические жидкости, не выносящие нагревания, освобождают от бактерий, пропуская через стерильные мелкопористые фильтры. Эти фильтры задерживают микроорганизмы, и называют их бактериальными фильтрами.

Бактериальные фильтры имеют разные номера. Фильтры № 1 имеют средний диаметр пор 0,3 мкм и являются наиболее надежными. Фильтры № 5 имеют самые большие отверстия пор, диаметром 1,2 мкм.

Перед употреблением мембранные фильтры стерилизуют кипячением. Фильтры помещают в теплую дистиллированную воду и кипятят 30 мин, меняя 2 – 3 раза воду.

Стерилизация паром под давлением – автоклавирование.

Наиболее надежным и универсальным методом стерилизации питательных сред и материалов является стерилизация их насыщенным паром под давлением. Производят ее в автоклаве, в котором стерилизуемые объекты нагревают чистым насыщенным паром при давлении выше атмосферного. Когда насыщенный пар встречается с более холодным объектом, он конденсируется, превращаясь в воду. При конденсации выделяется большое количество теплоты и температура стерилизуемого объекта быстро повышается.

Полная стерилизация питательных сред при 120°C и давлении 0,1 МПа обеспечивается нагреванием в течение 20 мин.

Правила работы с автоклавом.

Стерилизация в автоклаве производится при повышенном давлении, поэтому работа с ним требует определенной осторожности. Исправность автоклава в определенные сроки проверяют специалисты, которые устанавливают следующий срок проверки.

Системы автоклавов различаются, но все они имеют общие принципы устройства (**Рис. 15**), и правила работы с ними однотипны.

Во внутренний котел автоклава (стерилизационную камеру) помещают материал, подлежащий стерилизации.

В водопаровую камеру наливают воду с таким расчетом, чтобы уровень ее в водомерной трубке был между верхней (максимальной) и нижней (минимальной) чертой.

Крышку автоклава привинчивают болтами к корпусу. Завинчивают болты попарно, крест-накрест, чтобы избежать перекоса крышки, который может возникнуть при завинчивании болтов по кругу.

Открывают краны и включают источник обогрева. Когда пар из выпускного крана начинает выходить непрерывной струей, его закрывают и

наблюдают за постепенным повышением давления в рабочей камере по манометру.

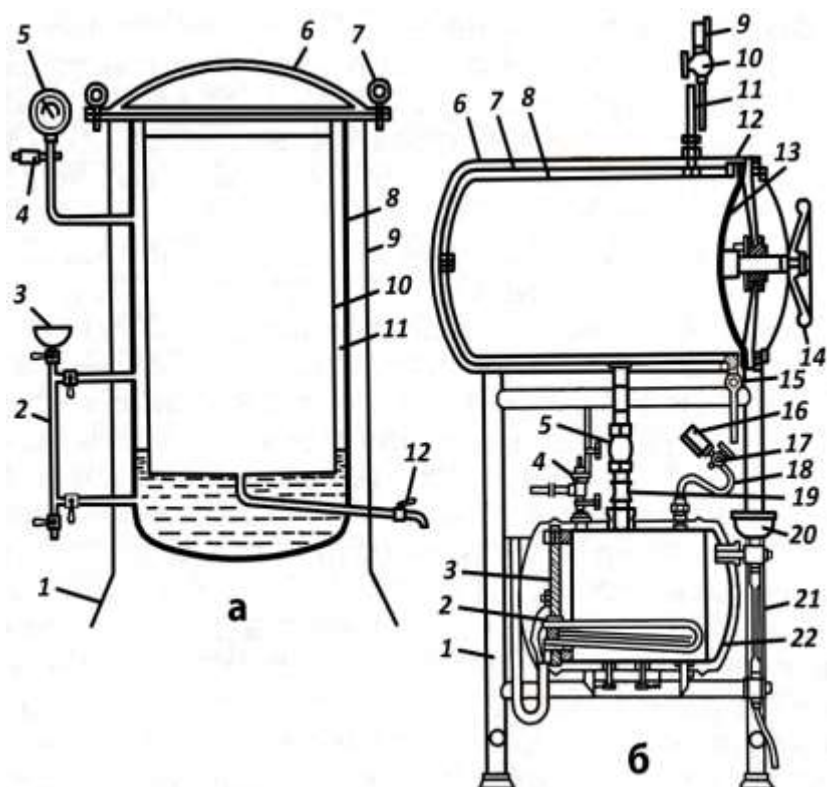


Рис. 15. Устройство автоклавов.

а – вертикальный автоклав:

1 – подставка; 2 – водомерная трубка; 3 – воронка; 4 – предохранительный клапан; 5 – манометр; 6 – крышка; 7 – винтовые зажимы; 8 – котел; 9 – кожух; 10 – камера стерилизации; 11 – водопаровая камера; 12 – паровыпускной клапан;

б – горизонтальный автоклав:

1 – постамент; 2 – нагревательный элемент; 3 – крышка котла; 4 – предохранительный клапан; 5 – вентиль; 6 – кожух; 7 – паровая камера; 8 – стерилизационная камера; 9 – манометр паровой камеры; 10 – трехходовой кран; 11 – сифонная трубка паровой камеры; 12 – опорное кольцо; 13 – крышка паровой камеры; 14 – штурвал; 15 – впускной кран; 16 – манометр котелка; 17 – трехходовой кран котелка; 18 – сифонная трубка котелка; 19 – патрубок; 20 – воронка; 21 – водоуказательная колонка; 22 – котелок.

Отсчет времени стерилизации начинают с того момента, когда в автоклаве установится заданное давление.

Между показаниями манометра и температурой кипения воды имеется определенная зависимость (Табл. 5). Время от времени эти соотношения следует проверять. Нарушение их указывает на неисправность автоклава и на необходимость его ремонта.

Таблица 5

Зависимость давления и температуры в камере автоклава

Показатели манометра		Температура кипения воды, °С
МПа	атм.	
0,00	0,0	100
0,02	0,2	105
0,04	0,4	110
0,05	0,5	112
0,06	0,6	114
0,07	0,7	116
0,08	0,8	117
0,09	0,9	119
0,10	1,0	121
0,15	1,5	127

Проверку осуществляют следующим образом: в стерилизационную камеру автоклава помещают 100 г бензойной кислоты с добавлением небольшого количества фуксина или метиленового синего. Если при показании манометра в 0,1 МПа бензойная кислота расплавится, образуя с красителем сплав, то значит, автоклав дает нужную температуру (120°С).

После окончания заданного срока стерилизации источник нагрева выключают, перекрывают вентиль водопаровой камеры, и только после этого постепенно открывают выпускной клапан. При быстром выпуске пара могут быть вырваны ватные пробки из стерилизуемой посуды.

После полного выхода пара отвинчивают болты крышки (снова крест-накрест) и открывают ее, ориентируя крышку на себя для защиты от выходящего пара.

Если во время стерилизации давление начинает подниматься выше заданного уровня, его регулируют, уменьшая нагрев или выпуская часть пара через предохранительный клапан. Последний должен быть отрегулирован так, чтобы при повышении давления излишек пара выходил автоматически.

Питательные среды.

Среды общего назначения.

Учитывая отраслевые сырьевые особенности, в качестве основного компонента питательных сред может быть использовано зерновое, виноградное, плодово-ягодное или мелассовое сусло. Однако наиболее универсальным и сбалансированным следует признать солодовое неохмеленное сусло с содержанием 8 – 10 % СВ.

Солодовое сусло.

Для приготовления сусла в лаборатории используют ячменный солод крупного помола с высокой осахаривающей способностью. В 1 л воды вносят 250 г солода и нагревают до 50°C. Через 30 мин температуру повышают до 55°C, а еще через 30 мин постепенно поднимают до 62,5 – 63°C. При этой температуре выдерживают до исчезновения реакции на крахмал (йодная проба). Полученное сусло отделяют от дробины путем фильтрации через марлю и вату, разбавляют водой до нужной концентрации, разливают по колбам и стерилизуют при 112°C 30 мин. Если рН ниже 5,5, то сусло подщелачивают 10%-ным раствором соды или едкого кали до получения рН 5,6 – 6,0. Полученное таким образом сусло желательно очистить от примесей кизельгуром или отстаиванием в холодильнике и фильтрацией через бумажный фильтр.

В отсутствие солодового вполне применимо зерновое сусло, осахаренное комплексом ферментных препаратов с обязательным внесением дрожжевой золки и 0,3 – 0,5 % дрожжевого автолизата перед автоклавированием.***

Для приготовления жидкой питательной среды осахаренное и отфильтрованное сусло разливают в колбы или пробирки на 1/2 – 3/4 объема, закрывают ватно-марлевыми пробками и автоклавируют 20 минут при 0,1 МПа.

Мелассовое сусло.

Густую мелассу отвешивают на технических весах в количестве 200 – 300 г, смешивают с водой в соотношении 1 : 3 и нагревают до 75°C, затем насыпают 4 % суперфосфата и повышают температуру до 85°C при постоянном помешивании. 33 %-ный раствор едкой щелочи в количестве 0,8 % по объему к исходной мелассе разводят в 30 – 50 см³ воды, добавляют к нагретой мелассе и хорошо перемешивают. В результате происходит выпадение осадка трикальцийфосфата, который увлекает за собой коллоиды мелассы и более крупные частицы, осадок быстро оседает на дно и меласса осветляется. После этого к мелассе добавляют 2,5 % сернокислого аммония и 2 % суперфосфата в виде вытяжки (1 г суперфосфата и 10 см³ воды нагревают до кипения и фильтруют через бумажный фильтр). Мелассу перемешивают с питательными солями и фильтруют через бумажный фильтр, лучше под вакуумом на воронке Бюхнера.

Осветленную мелассовую среду разводят водой до требуемой концентрации 5 – 8 % СВ по сахарометру и разливают в колбы, пробирки или бутылки; для приготовления твердых питательных сред добавляют агар.

Мелассовое сусло стерилизуют в автоклаве при избыточном давлении 0,05 МПа 30 минут или в аппарате Коха при 100°C в течение 1 часа трое суток подряд.

Сусло-агар.

В химическом стакане в сусло (8 – 10 % СВ) внести необходимое количество агар-агара (2,5 г / 100 см³) и выдержать 10 – 15 минут не перемешивая до полного его увлажнения. Стакан поставить на слабый огонь и, постоянно перемешивая, довести до кипения. Содержимое стакана перелить в колбу до 1/2 объема, закрыть ее ватно-марлевой пробкой и автоклавировать 20 минут при 0,1 МПа.

Если питательная среда не требует внесения каких-либо термолабильных ингредиентов, то ее можно сразу после автоклавирования разливать в заранее приготовленные стерильные высушенные чашки Петри. Если же предполагается внесение антибиотиков, факторов роста или других чувствительных к температуре компонентов, то среду в колбе необходимо остудить до 40 – 45°C, стерильно внести нужные компоненты, перемешать и разливать в чашки Петри. При этом желательно избегать образования комков для получения ровной поверхности питательной среды в чашках. После этого чашки со средой не следует более перемещать, пока агар полностью не остынет.***

Чтобы удалить образовавшийся конденсат и уменьшить его дальнейшее образование чашки необходимо подсушить. Для этого чашки с агаром переворачиваются крышкой вниз, дно чашки с агаром извлекается и ставится не ребро крышки. В таком положении в боксе под УФ лампой чашки выдерживаются ≈ 60 минут. Высушенные чашки закрываются и могут использоваться для работы, либо храниться в холодильнике, завернутыми в полиэтиленовый пакет, чтобы исключить пересыхание или случайное обсеменение среды. Чашки, хранившиеся в холодильнике, перед работой следует некоторое время выдержать при комнатной температуре или в термостате.

Скошенный сусло-агар.

Для приготовления скошенного сусло-агара, доведенную до кипения среду (см. «Сусло-агар») разливают в пробирки до 1/3 ее объема, закрывают ватно-марлевыми пробками и автоклавируют 20 минут при 0,1 МПа. По окончании стерилизации пробирки с горячей средой раскладывают на наклонной поверхности для образования скоса нужной высоты и дают полностью застыть. Остывшие пробирки переносят в штатив и используют по назначению.

Полужидкий сусло-агар.

В химическом стакане в сусло (8 – 10 % СВ) внести необходимое количество агар-агара (0,5 г / 100 см³) и выдержать 10 – 15 минут не перемешивая до полного его увлажнения. Стакан поставить на слабый огонь и, постоянно перемешивая, довести до кипения. Содержимое стакана разлить

в пробирки до 1/3 – 1/2 объема, закрыть ватно-марлевыми пробками и автоклавировать 20 минут при 0,1 МПа.

По окончании стерилизации пробирки раскладывают вертикально в штатив и после полного их охлаждения используют по назначению.

Ацетатная среда для выделения посторонних дрожжей.

На 1000 см³ водопроводной воды берут 10 г уксуснокислого натрия, 10 г хлористого аммония и 5 г глюкозы. Дрожжевой автолизат добавляют в среду в количестве 3 см³.

Среду разливают в пробирки по 5 см³ и стерилизуют в автоклаве при избыточном давлении 0,05 МПа в течение 30 мин.

Среда с монойодуксусной кислотой.

2 %-ный сусло-агар после автоклавирования охлаждают до 50°C. В остывшую среду асептически вносят рабочий раствор монойодуксусной кислоты до концентрации 2,5 % (97,5 см³ + 2,5 см³ кислоты). Приготовленную среду тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри. Конечная pH 5,8.

Посевы исследуемых проб инкубируют не менее 120 часов при 28 – 30°C.

На данной среде растут дрожжи, не относящиеся к роду *Saccharomyces*.

Рабочий раствор.

В предварительно проавтоклавированную воду внести монойодуксусной кислоты в количестве 7,44 мг на 1,0 см³.

Сусло-желатин.

К солодовому суслу концентрацией 8 – 10 % СВ прибавляют 15 % желатина и через 30 – 40 мин, когда желатин набухнет, среду подогревают до 40 – 50°C, фильтруют через ватно-марлевый фильтр и разливают в пробирки или колбы.

Стерилизуют в аппарате Коха при 100°C по 30 минут трое суток подряд.

Среда Сабуро для выращивания дрожжей.

К 100 см³ стерильной дрожжевой воды добавляют 5 г пептона, 4 г глюкозы, 1,8 г агара. После того как агар расплавится при нагревании, среду фильтруют и разливают в пробирки.

Стерилизуют 20 мин при избыточном давлении 0,05 МПа или в аппарате Коха дробной стерилизацией.

Синтетическая среда с лизином.

Рецептура (в г) синтетической среды с лизином приведена ниже.

Глюкоза	50
Лизин	3
KH_2PO_4	1
MgSO_4	1
FeSO_4	следы

Каждый компонент среды растворяют в воде отдельно, смешивают в указанном порядке и доводят водопроводной водой до 1000 см³.

В полученную жидкую синтетическую среду вносят агар (2,5%), расплавляют и разливают в пробирки по 10 см³. Среду стерилизуют 20 мин при давлении 0,05 МПа.

После автоклавирования пробирки ставят в штатив для получения скошенной среды.

Среда 10 для выявления и подсчета лактобактерий и лейкопостока.

На 1000 см³ неохмеленного солодового сусла (8 % СВ) или 1000 см³ дрожжевой воды добавляют 0,05 г $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, по 0,2 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, цистина или цистеина, KH_2PO_4 , цитрата аммония, 2,5 г ацетата натрия, 20 г сахарозы, 10 г пептона и 50 см³ дрожжевого автолизата.

Каждый компонент среды растворяют в указанном порядке в солодовом сусле (для выращивания лактобактерий) или дрожжевой воде (для выращивания лейкопостока). В первом случае рН среды 5,5, во втором – 6,0.

Растворив все компоненты и нормализовав рН, добавляют 2,5 % агара и стерилизуют трехкратно текущим паром.

Перед использованием в расплавленную среду добавляют стерильный мел (3 % к объему среды), тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри.

Молочный агар Богданова.

Используется в качестве среды для выявления и учета гнилостных бактерий.

Обезжиренное молоко разливают в пробирки по 5 см³ и трехкратно стерилизуют текущим паром либо 20 мин при 0,05 МПа. Отдельно готовят 5 %-ный водный агар, разливают его в пробирки по 4 – 5 см³ и стерилизуют 30 мин при давлении 0,1 МПа.

Перед посевом водный агар расплавляют, соединяют с молоком, и смесь выливают в чашки Петри, куда предварительно была внесена исследуемая проба.

Виноградное сусло.

Сусло помещают в колбу и нагревают до кипения в кипятильнике Коха, после охлаждения отфильтровывают от выпавших белковых веществ через

бумажный складчатый фильтр и разливают в пробирки по 5 см³, стараясь не смочить горлышка, затем в пробирках пастеризуют.

Предназначается для выращивания дрожжей.

Вино с сахаром.

В белое сухое вино добавляют 5 – 10 % сахара. После его растворения среду фильтруют и разливают по пробиркам.

Среда используется для посева дрожжей и уксуснокислых бактерий.

Вино с суслом.

Среда состоит из виноградного сусла – 1/3 объема, сухого вина – 1/3 и водопроводной воды – 1/3 объема. Среду фильтруют и разливают в пробирки.

Рекомендуется для посева уксуснокислых бактерий.

Виноградное сусло разбавленное.

Сусло разбавляют водой до содержания сахаров 5 %, добавляют 1 % автолизата дрожжей и доводят рН до 5 – 6 добавлением 1N раствора щелочи.

Среда рекомендуется для молочнокислых бактерий.

Яблочное сусло.

В свежий или консервированный яблочный сок добавляют при необходимости сахар до массовой концентрации 10 – 12 г/100 см³. Концентрация титруемых кислот не должна превышать 6 – 7 г/дм³. При излишней кислотности сок разбавляют водой.

Стерилизуют в автоклаве текучим паром или в кипятильнике Коха однократно в течение 40 – 45 мин.

Применяют для культивирования дрожжей.

Смесь солодового сусла с яблочным.

В состав среды входят: солодовое сусло с 5 % сухих веществ – 1/2 объема и яблочное сусло – 1/2 объема. Среду осветляют, стерилизуют текучим паром 3 дня подряд по 30 мин.

Предназначается для выращивания молочнокислых бактерий.

Капустная среда.

200 г измельченной капусты помещают в кастрюлю, заливают 1000 см³ воды и кипятят в течение 10 мин, затем отжимают через двойной слой марли. Полученную жидкость фильтруют и в 2 раза разбавляют водой. К отвару

добавляют 2 % глюкозы и 1 % пептона или 25 см³ солодового сусла (10 % СВ) и 1,25 см³ кукурузного экстракта.

Для приготовления среды можно использовать сухую капусту. Измельченную капусту следует сушить в тени при температуре 20 – 35°C при потоке свежего воздуха. Для приготовления питательной среды 6 – 8 г сухой капусты кипятят в 1000 см³ воды.

Среду разливают в пробирки высоким столбиком по 5 – 10 см³, стерилизуют в автоклаве при 121°C в течение 30 мин.

Среда предназначена для накопления и выделения молочнокислых бактерий, с добавлением спирта 0,95 см³ на 5 см³ среды.

Картофельная вода.

20 г очищенного от кожуры и протертого сырого картофеля добавляют к 1000 см³ водопроводной воды, настаивают 4 ч, кипятят 15 мин, фильтруют через складчатый фильтр, разливают в пробирки по 5 см³ и стерилизуют при избыточном давлении 0,1 МПа в течение 20 мин.

Дрожжевая вода.

На 1000 см³ водопроводной воды берут 80 г прессованных дрожжей или 20 г сушеных, смесь кипятят в течение 20 минут, разливают в бутылки и стерилизуют при избыточном давлении 0,1 МПа в течение 30 – 40 минут.

После отстаивания в течение нескольких дней дрожжевая муть оседает, а дрожжевая вода становится прозрачной.

Дрожжевой автолизат.

Вар. 1.

Для приготовления можно использовать прессованные или сушеные пекарские дрожжи.

200 г прессованных дрожжей размешивают с 100 см³ водопроводной воды или 100 г сушеных дрожжей с 400 см³ воды, добавляют поваренной соли в количестве 0,15 % к весу прессованных дрожжей и 0,5 % к весу сушеных дрожжей, смесь помещают в термостат при 50 – 55°C на 48 ч, затем нагревают до кипения и фильтруют через складчатый бумажный фильтр, разливают в стеклянную посуду и стерилизуют при избыточном давлении 0,1 МПа в течение 30 мин.

Вар. 2.

Прессованные дрожжи заливают равным по массе количеством воды: полученную суспензию клеток покрывают тонким слоем толуола и выдерживают трое суток при температуре 60°C, время от времени перемешивая. После этого суспензию несколько минут кипятят, дают остыть и с помощью 1 Н раствора КОН доводят значение рН до 6, затем отстаивают. Надосадочная жидкость (дрожжевой автолизат) должна быть прозрачной, ее

сливают и отфильтровывают через бумажный фильтр на воронке Бюхнера под разряжением.

Стерилизуют автоклавированием 20 мин при 112° С.

Таблица 6

Состав основных синтетических сред

<i>Ингредиенты (на 1000 см³ дистиллированной воды)</i>	<i>Морфологический агар</i>	<i>Азотистая основа</i>	<i>Углеродная основа</i>	<i>Безвитаминная среда</i>
Источники углерода и азота, г				
Глюкоза	10	-	10	10
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,5	5	-	5
Аспарагин	1,5	-	-	-
Макроэлементы, г				
KH ₂ PO ₄	0,85	0,85	0,85	0,85
K ₂ HPO ₄	0,15	0,15	0,15	0,15
MgSO ₄	0,5	0,5	0,5	0,5
NaCl	0,1	0,1	0,1	0,1
CaCl ₂	0,1	0,1	0,1	0,1
Аминокислоты, мг				
L-Гистидин HCl	10	10	1	10
DL-Метионин	20	20	2	20
DL-Триптофан	30	20	2	20
Витамины, мкг				
Пантотенат кальция	2000	2000	2000	—
Фолиевая кислота	2	2	2	—
Инозит	10000	10000	10000	—
Никотиновая кислота	400	400	400	—
Парааминобензойная кислота	200	200	200	—
Пиридоксин HCl	400	400	400	—
Рибофлавин	200	200	200	—
Тиамин HCl	400	400	400	—
Биотин	20	20	20	—
Микроэлементы, мкг				
H ₃ PO ₃	500	500	500	500
CuSO ₄	40	40	40	40
KJ	100	100	100	100
FeCl ₃	200	200	200	200
MnSO ₄	400	400	400	400
Na ₂ MoO ₄	200	200	200	200
ZnSO ₄	400	400	400	400
Промытый агар, г	18	—	—	—
Количество сухой готовой среды фирмы «Difco» на 1 л, г	35	6,7	11,7	16,7

Стерильный мел.

Имеющийся в продаже мелкоразмолотый мел насыпают в стерильные пробирки с ватными пробками по 0,3 – 0,5 г и стерилизуют сухим жаром 1 час при 170°C.

Стерильная водопроводная вода.

Водопроводную воду разливают в пробирки по 10 или 9 см³ и в колбы по 50 и 100 см³, закрывают ватными пробками и стерилизуют в автоклаве 30 минут при давлении 0,1 МПа или в аппарате Коха при 100°C по 1 часу 3 суток подряд.

Среды накопительные для дрожжей.

Таблица 7

Среды накопительные для дрожжей

<i>Вариант</i>	<i>Ингредиенты</i>	<i>Количество</i>
1.	Глюкоза (сахароза)	80,0 см ³
	Дрожжевая зола	5,0 г
	Дрожжевая вода (0,15 г/см ³)	до 1000,0 см ³
2.	Дрожжевой автолизат	2,0 см ³
	Дрожжевая зола	5,0 г
	Сусло неохмеленное	до 1000,0 см ³
3.	Глюкоза (сахароза)	80,0 г
	Кислота лимонная	6,0 г
	Дрожжевой автолизат	10,0 см ³
	Дрожжевая зола	5,0 г
	Вода	до 1000,0 см ³

Приготовленные среды автоклавируются при 0,1 МПа в течение 20 минут. Могут использоваться, как основа для агаризованных сред.

При необходимости вносятся антибиотики.

Среды для аскоспорообразования.

Среда Городковой для выявления спор у дрожжей.

Состав среды следующий (г):

Пептон	1,0
Поваренная соль	0,5
Глюкоза	0,25
Агар	2,0
Вода	до 100,0 см ³

Иногда вводят еще 1 % мясного экстракта.

Среду нейтрализуют содой (питьевой) до pH 7,3, доводят до кипения и кипятят до тех пор, пока не расплавится агар, фильтруют и разливают в пробирки по 5 см³.

Стерилизуют при избыточном давлении 0,05 МПа в течение 20 мин.

Ацетатный агар Фоувелла.

На 1000 см³ дистиллированной воды берут 5 г CH₃COONa·3H₂O и 20 г агара. pH среды должно быть 5 – 7.

Автоклавируют 15 мин при 121°C.

Ацетатный агар Мак-Клари.

CH ₃ COONa·3H ₂ O	8,2 г
Глюкоза	1,0 г
KCl	1,8 г
Дрожжевой экстракт	2,5 г
Агар	15,0 г
Дистиллированная вода	до 1000,0 см ³

Автоклавируют 15 мин при 121°C.

Среда с дрожжевым экстрактом и глюкозой.

Дрожжевой экстракт	5,0 г
Глюкоза	50,0 г
Агар	20,0 г
Дистиллированная вода	до 1000,0 см ³

Автоклавируют 20 мин при 112° С.

Агаризованная дрожжевая вода.

Готовят, добавляя к 1000 см³ дрожжевой воды 15 г агара.

Автоклавируют 15 мин при 121° С.

Среда Старки.

K ₂ HPO ₄	1,0 г
CaCl ₂	0,05 г
KH ₂ PO ₄	0,25 г
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 г
Агар	20,0 г
Водопроводная вода	до 1000,0 см ³

Автоклавируют 15 мин при 112° С.

После стерилизации добавляют 6,0 см³ этилового спирта.

Овощной агар.

Предварительно готовят экстракт овощей путем автоклавирования 10 минут при 112°C равных частей промытых и мелко нарезанных моркови, сахарной свеклы, огурцов и картофеля в четырех частях воды, после чего экстракт отфильтровывают через ткань, отжимая осадок.

К 1000 см³ полученного экстракта (4 % СВ, рН 6,7) добавляют 20 г сухих дрожжей и 20 г агара.

Автоклавируют 15 мин при 121°C.

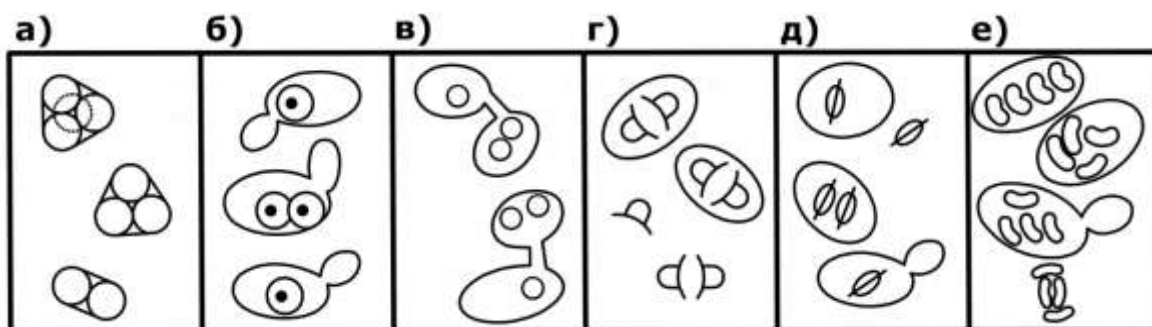


Рис. 16. Споры дрожжей.

а) споры *Saccharomyces*;

б) споры *Debaryomyces* или *Torulaspora*;

в) споры *Zygosaccharomyces*;

г) шляпovidные споры *Pichia membranaefaciens*;

д) сатурновидные споры *Pichia spp.* и *Williopsis saturnus*;

е) бобовидные споры *Kluyveromyces marxianus* и *Schizosaccharomyces spp.*

Гипсовые блоки.

8 частей гипса ($2\text{CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) смешивают 3 частями воды и помещают пасту в цилиндрические формы из бумаги или фольги высотой 3 – 4 см. Поверхность тщательно сглаживают. После застывания блоки освобождают от форм, помещают в высокие чашки и стерилизуют при 110 – 120°C в течение 2 часов.

Перед посевом в чашки наливают стерильной воды слоем 1 см или раствора содержащего 1 % маннита и 0,5 % K_2HPO_4 .

На средах для спорообразования дрожжи инкубируют при температурах несколько меньших, в сравнении с оптимальными для вегетативного роста – в большинстве случаев при 20 – 25°C. Время инкубации составляет до 4 – 6 недель при еженедельном микроскопировании.

Начинающие исследователи нередко затрудняются отличить аскоспоры от внутриклеточных бесполов спор (эндоспор) или от крупных глобул жира. В таких случаях можно прибегнуть к окраске (см. "Окраска спор дрожжей").

Освещение сред.

Осветленные жидкие, агаризованные или желатиновые среды необходимы в диагностических исследованиях и для получения хорошо видимых признаков глубинного роста и изолированных колоний микроорганизмов.

В ряде случаев прозрачную среду можно получить, отфильтровав ее от осадка через вату. Когда этого бывает недостаточно, среды освещают с помощью белков куриных яиц. Для освещения 500 см³ среды достаточно белка одного яйца. Белок тщательно отделяют от желтка и встряхивают с равным объемом воды до образования густой пены. Взбитый белок выливают в предварительно расплавленную и затем остуженную до 45 – 50°C среду. Перед внесением белка проверяют значение pH среды и, если необходимо, среду подщелачивают до pH 7,0 – 7,3. Среду с белком тщательно перемешивают и прогревают в кипящей водяной бане в течение часа. Белок свертывается и адсорбирует все взвешенные в среде частицы. Среду быстро отфильтровывают в горячем виде через вату.

Синтетические агаризованные среды, внесение белка в которые нежелательно, освещают следующим образом. Среду, налитую в химический стакан, автоклавируют и оставляют после стерилизации в закрытом автоклаве на 10 – 12 ч. При таком медленном остывании среды все взвешенные частицы оседают на дно. Застывшую среду извлекают из стакана, прозрачную часть среды срезают, помещают в колбу и вновь стерилизуют.

Питательные среды и условия хранения чистых культур дрожжей.

Длительное поддержание чистых культур микроорганизмов, без потери активности и производственных качеств, необходимо как при хранении в коллекциях и проведении научно-исследовательских работ, так и при эксплуатации в производстве.

Основной задачей при хранении чистых культур промышленных штаммов микроорганизмов в музейных коллекциях является правильный выбор условий для сохранения их производственно ценных свойств. Общей тенденцией при этом является максимальное замедление всех жизненных процессов, что достигается различными приемами. Жизнеспособность клеток при этом должна быть сохранена. Кроме того, способы хранения культур должны быть по возможности менее трудоемки и надежны.

Из-за различий биологических свойств видов невозможно использовать с равноценными положительными результатами один общий способ хранения для разных культур дрожжей. Большой опыт по хранению культур микроорганизмов, в том числе и дрожжей, накоплен сотрудниками крупных национальных коллекций, в которых имеется возможность проверять и оценивать разные методы хранения применительно к широкому набору дрожжевых организмов.

Наиболее широко применяемый способ – это поддержание культур путем их периодических пересевов. В последние два десятилетия получили распространение также методы хранения микробных культур под минеральным маслом и лиофильная сушка. Так как эти три метода применяются уже много лет, то имеется возможность сравнительной оценки их пригодности для хранения разных видов дрожжей. Другие, менее широко используемые или недавно разработанные методы можно рекомендовать лишь для проверки с обязательным дублированием культур, которые поддерживаются обычными способами.

Периодические пересевы.

Обычно культуры поддерживают, пересевая их на агаризованных средах в двойной повторности. Одна пробирка, которую после засева совсем не открывают, служит контрольной, а из второй по мере надобности делают отсевы.

Частота пересевов.

Сроки пересевов определяют для большинства культур дрожжей скоростью высыхания среды. Она зависит от температуры и влажности помещения, где хранят пробирки.

Промежутки между пересевами можно увеличить за счет более плотного закупоривания пробирок и снижения температуры хранения. Так, использование пробирок с завинчивающимися металлическими крышками вместо обычных ватных пробок предохраняет от высушивания, но хуже обеспечивает чистоту сохраняемых культур. Применение вазелинового масла для снижения скорости высыхания культур также имеет свои недостатки, о чем речь будет идти ниже. Поэтому хорошо сделанные ватные пробки (их можно сверху заливать парафином) все же остаются лучшим средством закрывания пробирок. Они обеспечивают достаточный газообмен, хорошо предохраняют от микробного загрязнения и легко изготавливаются.

Ватные пробки, однако, не предохраняют культуры от заражения их микофильными клещами (*mites*). Для профилактики используют следующий прием. Перед посевами или пересевами культур пробку слегка выдвигают из пробирки и наносят на нее каплю раствора, содержащего 10 г сулемы, 50 см³ глицерина, 500 см³ этилового спирта и 450 см³ воды. Затем пробку вдвигают в пробирку и несколько раз проворачивают ее, чтобы смочить внутренние стенки пробирки. В раствор можно добавить какой-либо краситель для контроля равномерности смачивания.

Температура.

Если хранение ведется при температуре в пределах 15 – 20°C, то после пересева пробирки сразу же помещают в коллекционное помещение, за исключением тех культур, которые требуют для роста более высокой температуры. Психрофильные дрожжи выращивают и хранят при 3 – 4°C в холодильнике. При низкой температуре после появления хорошего роста можно хранить и все другие дрожжи.

Среды.

Во многих лабораториях и коллекциях дрожжи поддерживают и хранят на сусло-агаре. Было показано, однако, что на этой сложной среде при длительном хранении происходит изменение физиологических свойств, характерных для вида, за счет адаптаций или стабилизации мутантов. В связи с этим для хранения более пригодна среда следующего состава, которую используют для голландской коллекции (в %):

Дрожжевая вода	pH 5,8—6,0	до 100,0 см ³
Глюкоза		4,0 г
Пептон		0,5 г

Для винных дрожжей предложена среда, на которой дрожжи хорошо спорулируют и долго хранятся:

Морковь тертая	125 г
Вода	1000 см ³

Настоять 1 час, довести до кипения,
кипятить 10 минут,
отфильтровать через вату, pH 5.

Агар	30 г
------	------

Пивоваренные дрожжи лучше поддерживать на сусло-агаре или среде следующего состава (в %):

Сусло	3
Дрожжевой экстракт	3
Пептон	5
Глюкоза	1
Агар	2

На дрожжевых и спиртовых заводах, работающих на мелассе для хранения производственных культур лучше использовать среду следующего состава:

Мелассовое сусло 5 % СВ	100 см ³
Солодовое сусло 12 % СВ	100 см ³
Дрожжевой автолизат	2 см ³
Агар	5 г

В некоторых коллекциях дрожжи поддерживают в жидких средах (сусло с дрожжевым автолизатом, пептоном и глюкозой) с пересевами через 4 мес.

Хранение под минеральным маслом.

Заливка агаровых культур минеральным маслом преследует цель задержать высыхание и тем самым увеличить сроки пересевов.

Наиболее пригодно для заливки культур дрожжей высокоочищенное медицинское вазелиновое масло плотностью 0,8 – 0,9. Масло стерилизуют в автоклаве в течение 1 ч при 121°C, а затем прогревают для удаления влаги в сушильном шкафу при температуре не выше 150°C или выдерживают при комнатной температуре не менее 2 – 3 дней.

Дрожжи выращивают на сусло-агаре или другой среде, выбранной для хранения.

Среду готовят в пробирках таким образом, чтобы столбик был достаточно высоким, а скос небольшим.

Через 4 – 6 суток, когда штрих хорошо сформируется, культуры заливают маслом таким образом, чтобы слой его над верхним краем агарового косяка не превышал 1 см. После заливки культуры хранят в вертикальном положении либо при комнатной температуре, либо в холодильнике при 4 – 6°C.

Пересев дрожжей из-под вазелинового масла производят один раз в год. Для пересевов используют свежие косяки той же среды, на которой культуры хранились.

Опыт многих коллекций свидетельствует об успешных результатах этого способа хранения дрожжевых культур. Для винных дрожжей, в частности, было показано, что при хранении под вазелиновым маслом с пересевами даже через 2 – 4 года они не теряют бродильных свойств и хорошо выживают. Имеются указания на сохранение живых клеток дрожжей под маслом до 10 лет и более без пересевов.

К недостаткам этого метода хранения следует отнести следующие:

1) при пересевах масло смешивается с инокулятом, и штрихи получаются хуже обычных;

2) масло разбрызгивается при обжигании петли и от этого возникает возможность инфицирования помещения;

3) требуется специальная очистка использованных пробирок от масла;

4) при стерилизации масла высокими температурами в нем могут образовываться токсичные для дрожжей вещества.

С учетом всех преимуществ при достаточном опыте персонала и правильной организации работы в лаборатории, перечисленными недостатками можно пренебречь.***

Лиофилизация.

Лиофилизацией называют процесс высушивания под вакуумом из замороженного состояния. Техника лиофилизации и хранения лиофилизированных культур сильно варьирует в разных лабораториях. Вариации касаются сред и сроков выращивания, применения суспензионных жидкостей, температуры замораживания, условий хранения и восстановления культур.

Дрожжи, подлежащие лиофилизации, выращивают в оптимальных условиях на средах, не слишком обогащенных питательными веществами. Для этой цели пригодна среда Сабуро или глюкозопептонная следующего состава (в %):

Глюкоза	1,0
Пептон	1,0
Мясной и дрожжевой экстракты	по 0,5

NaCl	0,5
K ₂ HPO ₄	0,3
Агар	2,5

Дрожжи выращивают и на сусло-агаре. Из 2 – 5-суточных культур готовят густую суспензию в специальных суспензионных жидкостях, содержащих защитные вещества, которые можно разделить на три группы:

1) коллоидные среды животного, растительного и минерального происхождения, такие как сыворотка крови, плазма, желатина, снятое молоко, агар-агар, гель гидрата окиси алюминия и др.;

2) среды с углеводами (чаще всего 10%-ный раствор сахарозы) и продуктами гидролиза белков – пептоном и аминокислотами;

3) сложные среды, в состав которых входят вещества, образующие как коллоидные, так и истинные растворы.

Хорошие результаты получены в голландской коллекции (CBS, г. Дельфт) при использовании в качестве защитной среды раствора, содержащего 7,5 % инозита, 2 % глутамата натрия и 5 % декстрина. pH такой среды доводят до 7,0 с помощью NaOH.

Ниже приведены 2 варианта сложных защитных сред.

Вариант 1

Желатина, %	1
Дрожжевой экстракт, %	1
Глюкоза, %	0,5
Аскорбиновая кислота, %	0,25
Дистиллированная вода	до 100,0
pH	5,5

Вариант 2

Пептон, г	15
Бычья сыворотка, см ³	100
Сахароза, г	30
Дистиллированная вода, см ³	200

Использование 10 – 20 %-ого раствора сахарозы дает хорошую выживаемость сразу после лиофилизации, но при длительном хранении жизнеспособность дрожжей резко снижается из-за высокой остаточной влажности материала.

Важным моментом в процессе лиофилизации является замораживание суспензии. Для дрожжей при лиофилизации обычно применяют охлаждение от $\square 30^{\circ}\text{C}$ до $\square 70^{\circ}\text{C}$, однако температура около $\square 15^{\circ}\text{C}$, способствующая медленному замораживанию, дает наилучшие результаты. Есть указания также на успешное использование режима быстрого замораживания дрожжей при температуре смеси сухого льда и спирта $\square 78^{\circ}\text{C}$ и сверхбыстрого замораживания в жидком азоте при $\square 196^{\circ}\text{C}$.

Замороженный материал не должен оттаивать в процессе высушивания. Продолжительность высушивания меняют в зависимости от обрабатываемого материала, его объема, состава защитной среды и используемой аппаратуры. Чем мельче кристаллы, образовавшиеся при замораживании, тем быстрее проходит высушивание. Остаточная влажность сказывается на сохранении свойств лиофилизированных дрожжей и на продолжительности последующего их хранения без потери жизнеспособности.

Сразу же после окончания процесса лиофилизации важно определить жизнеспособность обработанной культуры, а в случае, когда была известна концентрация живых клеток в исходной суспензии, можно установить и процентное отношение оставшихся живыми от начального количества клеток.

Реактивацию лиофилизированных культур производят путем переноса части материала либо сразу же в жидкую питательную среду, либо путем предварительного 8-часового выдерживания в дистиллированной воде с последующим пересевом на сусло-агар.

Запаянные ампулы с лиофилизированными культурами хранят в темноте при комнатной температуре или в холодильнике с температурой 4 – 6°C. Последнее предпочтительнее, особенно для дрожжей с высокой остаточной влажностью материала.

Итоги 19 – 20-летнего хранения культур дрожжей – представителей 17 родов, всего 557 штаммов – в голландской коллекции позволили установить разную пригодность этого метода хранения для отдельных видов. Дрожжи с мелкими клетками и аскоспорами такие, как *Pichia*, *Hansenula* и *Debaryomyces*, показали хорошую выживаемость, а крупноклеточные слабоспорулирующие или неспорулирующие дрожжи родов *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Dekkera* и *Brettanomyces* выживали хуже.

Таким образом, и этот широко применяющийся сейчас метод хранения микробных культур не следует рассматривать как универсальный, одинаково пригодный для разных видов дрожжей.

Методы криогенного хранения.

Замораживание дрожжей проводят при разных режимах, включая температуры от -10°C до -196°C и различные скорости охлаждения. Устойчивость дрожжей к повреждающим эффектам при замораживании повышается при добавлении защитных веществ: глицерина, сахарозы, инозита, диметилсульфоксида, полиэтиленгликоля.

В ампулу объемом 1,2 мл вносят 0,2 мл суспензии клеток дрожжей из стационарной фазы (начальная концентрация клеток $10^6 - 10^8$ клеток/см³), 0,5 см³ 10 %-ого раствора глицерина, 6 %-ого инозита или другого защитного вещества. Ампулы запаивают и помещают в жидкостно-фазовый рефрижератор с температурой -70°C со скоростью охлаждения 1 – 2,5°C в минуту в зоне критических температур – от -5°C до -35°C . Замороженные

микроорганизмы хранят в жидком азоте при -196°C в металлических контейнерах или стеклянных дьюарах. Существуют контейнеры-рефрижераторы разного объема:

1) 10 л на 250 ампул для краткосрочного хранения в экспериментальной работе;

2) 35 л на 900 ампул в канистрах;

3) 185 л на 12 000 ампул или 1000 штаммов в 12 повторениях.

Для быстрого оттаивания ампулы погружают в водяную баню с температурой $35 - 45^{\circ}\text{C}$ на 2 мин. При этом необходимо защитить глаза от возможного взрыва неплотно запаянных ампул. Высев производят на богатую питательную среду.

Трехлетнее хранение пивных дрожжей в жидком азоте показало хорошую их выживаемость без изменения ценных производственных свойств.

Хранение на адсорбентах.

В качестве адсорбентов используют почву, песок, каолин, силикагель, вату и фильтровальную бумагу. Этот способ хранения не имеет разработанной стандартной техники. Высокая выживаемость и физиологическая активность обеспечивается при хранении дрожжей в силикагеле, содержащем различные микроэлементы. Двухсуточные культуры дрожжей, полученные на синтетической среде с 1 % парафина на качалках, смешивали со 150 см^3 стерильных шариков силикагеля и оставляли в термостате при 32°C на 24 ч. Через сутки определяли рН среды и доводили при необходимости до 7 – 8. Затем культуральную жидкость сливали, шарики силикагеля с дрожжами помещали в стерильные чашки Петри и высушивали в эксикаторе при пониженном давлении в течение 5 – 6 суток. После высушивания культуры дрожжей хранили в течение года при комнатной температуре в запаянных стеклянных ампулах при давлении 13,33 кПа. Для реактивации 200 мг шариков силикагеля измельчали в фарфоровой ступке, порошок переносили в 3 – 5 мл стерильной воды и после кратковременного выдерживания делали высев на питательную среду.

Описан способ хранения дрожжевых культур на вате и полосках фильтровальной бумаги, в 10 %-ном растворе сахарозы в почве.

Хранение культур винных дрожжей в виде спор.

На суслowych средах винные дрожжи плохо спорулируют и быстро отмирают. В. В. Абрамовичем был разработан метод получения активно спорулирующих культур для длительного хранения их в состоянии спор.

Дрожжевой осадок из сброженного сусла переносят на 2 – 3 %-ный голодный (водный) агар, где 60 – 80 % клеток образуют споры. Дрожжи сохраняют жизнеспособность на этой среде до двух и более лет. Этим способом было проверено 18 рас винных дрожжей. Подавляющее

большинство проверенных культур вызывало активное брожение через 1,5 – 2,2 года хранения.

Н. И. Бурьян предложила для винных дрожжей способ хранения без потери их основных производственно ценных свойств (энергии размножения и дыхания, бродильной активности, кислотоустойчивости, спиртоустойчивости) путем чередования периодов активного размножения и пребывания в состоянии спор.

Дрожжи предварительно выращивают 48 ч на среде с 5 % (по объему) автолизата пивных дрожжей и 2 % глюкозы, переносят для спорообразования на измененную среду Адамса (2 % агара + 0,14 % уксуснокислого натрия), затем 10 суток выдерживают при 15°C, а для длительного хранения переносят в помещение с температурой 10°C. Через 9 – 10 мес. дрожжи переводят в активное состояние, засевая споровым материалом колбы со средой, содержащей 18 – 20 % сахара (рН 2,7—3,0), а по окончании брожения – в новую серию колб, среда в которых содержит 28 – 30 % сахара (рН 5,5). Эти пересевы занимают приблизительно 2 мес., после чего дрожжи вновь переносят на голодный агар.

Хранение микробных культур под вакуумом (*метод Сорделли*).

Небольшое количество дрожжей с агаровой среды вводят в маленькую пробирку, которую закрывают ватной пробкой. Пробирку помещают в более крупную пробирку из тугоплавкого стекла. На дно ее предварительно вносят несколько стеклянных бус и кристаллов КОН. Пробирку закрывают резиновой пробкой со стеклянной трубкой, через которую производят откачку воздуха до 1,3 – 6,6 кПа. Трубку запаивают парафином. Пробирки хранят при комнатной температуре.

Хранение коллекционных культур дрожжей в дистиллированной воде (*метод Кастеллани*).

Пробирки с 8 – 10 см³ стерильной дистиллированной воды засевают большим количеством инокулята с глюкозного или суслового агара и хранят при комнатной температуре. По мере испарения воды ее добавляют в пробирки. Жизнеспособность дрожжей сохраняется в этих условиях до двух лет и более. Основным условием успешного хранения дрожжей в дистиллированной воде является обильный инокулят.

Этот способ оказался непригодным для таких слабоспорулирующих дрожжей, как *Hanseniaspora*, *Endomycopsis*, *Nematospora*, и некоторых *Saccharomyces*.

Хранение в манните.

Предлагается способ хранения дрожжей в активной форме, при котором чистую культуру суспендируют в 10 %-ном растворе маннита, играющего

роль осмотического стабилизатора, с добавлением 0,2 % β -фенилэтанола в качестве бактерицидного агента.

При концентрации биомассы дрожжей $1,0 - 2,5 \cdot 10^8$ клеток/см³ и температуре хранения 25°C гарантируется сохранение свойств дрожжей в течение года.

Хранение маточных хлебопекарных и спиртовых дрожжей.

Маточные дрожжи, обладающие высокой ферментативной активностью, стойкостью и микробиологической чистотой, проявляют хорошую устойчивость при хранении. Но даже незначительные отклонения от требуемых показателей приводят к быстрой потере активности культуры. Для хранения маточных дрожжей ЧК и ЕЧК в виде молока устанавливают по два сборника из нержавеющей стали, чтобы создать условия их попеременной мойки и профилактического ремонта. Сборники должны быть снабжены мешалками, охлаждающими системами, указателями уровня и выносными термометрами. При монтаже сборников предусматривают возможность самостоятельной промывки и пропарки любого участка трубопровода в любом направлении, в том числе и на выпуск в канализацию.

За техническим состоянием коммуникаций, змеевиков и всей запорной арматуры маточного отделения должен быть строгий надзор.

Для стабилизации и улучшения исходных показателей культуры при хранении дрожжей ЧК рекомендуется использовать добавки из расчета на 1 кг прессованных дрожжей (Табл. 8).

Таблица 8

Стабилизаторы маточных дрожжей ЧК

<i>Сроки хранения молока, (сутки)</i>	<i>Препарат</i>	<i>Дозировка, (г/кг)</i>
10	NaCl	17
20	КН₂РO₄	40
	или KBr	2
	или низин	0,05
30	сорбиновая кислота	2
	или биомицин	10

На Воронежском дрожжевом заводе смонтирован специальный сборник-термостат, снабженный барботером и охлаждающей рубашкой. К суспензии хранящихся дрожжей добавляют расчетное количество мелассы при температуре 10 – 12°C, выдерживают 2 – 3 ч до возникновения слабого спиртового брожения, затем охлаждают до 1°C и хранят при этой

температуре. Конвективные токи CO_2 , выделяющиеся в процессе брожения, удерживают дрожжи во взвешенном состоянии.

Суспензию для засева можно подавать непосредственно из термостата, в котором создается избыточное давление 30 кПа ($0,3 \text{ кгс/см}^2$), поэтому термостат лучше устанавливать в непосредственной близости к дрожжерастильным аппаратам.

Культуральные свойства.

К культуральным, или макроморфологическим, свойствам относятся характерные особенности роста микроорганизмов на плотных и жидких питательных средах. При изучении культуральных свойств дрожжей и дрожжеподобных грибов вполне применимы термины и определения, используемые в бактериологии для характеристики особенностей бактериального роста.

Рост на плотных средах.

На поверхности плотных питательных сред в зависимости от посева микроорганизмы могут расти в виде колонии, штриха или сплошного газона.

Колонией называют изолированное скопление клеток одного вида, выросшее в большинстве случаев из одной клетки.

В зависимости от того, где развивались клетки (на поверхности плотной питательной среды, в толще ее или на дне сосуда), различают поверхностные, глубинные и донные колонии.

Образование *поверхностных колоний* – наиболее существенная особенность роста многих микроорганизмов, в том числе и дрожжей, на плотном субстрате (Рис. 17, 18). Такие колонии отличаются большим разнообразием. При их описании учитывают следующие признаки:

форма – округлая, амёбовидная, неправильная, ризоидная и т.д.;

размер (диаметр) – измеряют в миллиметрах; если размеры колонии не превышают 1 мм, то их называют точечными;

поверхность – гладкая, шероховатая, бороздчатая, складчатая, морщинистая, с концентрическими кругами или радиально исчерченная;

профиль – плоский, выпуклый, кратерообразный, конусовидный и т.д.;

блеск и прозрачность – колония блестящая, матовая, тусклая, мучнистая, прозрачная;

цвет – бесцветная (грязно-белые колонии относят к бесцветным) или пигментированная – белая, желтая, золотистая, оранжевая, сиреневая, красная, черная и т.д.; особо отмечают выделение пигмента в субстрат;

край – ровный, волнистый, зубчатый, бахромчатый и т. д.;

структура – однородная, мелко- или крупнозернистая, струйчатая и т.д.; край и структуру колонии определяют с помощью лупы или при малом

увеличении микроскопа. Для этого чашку Петри помещают на столик микроскопа крышкой вниз;

консистенция – определяется прикосновением к поверхности колонии петлей; может легко сниматься с агара, быть плотной, мягкой или врастающей в агар, слизистой (прилипает к петле), тягучей, иметь вид пленки (снимается целиком), быть хрупкой (легко ломается при прикосновении петлей).

Глубинные колонии, напротив, довольно однообразны. Они по виду могут быть похожи на более или менее сплюсненные чечевички, в проекции, имеющие форму овалов с заостренными концами. Некоторые глубинные колонии напоминают пучки ваты с нитевидными выростами в питательную среду. Образование глубинных колоний часто сопровождается разрывом плотной среды, если микроорганизмы выделяют углекислоту или другие газы.

Донные колонии разных микроорганизмов обычно имеют вид тонких прозрачных пленок, стелющихся по дну.

Размеры и многие другие особенности колонии могут изменяться с возрастом и зависеть от состава среды. Поэтому при их описании указывают возраст культуры, состав среды и температуру культивирования.

При описании роста микроорганизмов *по штриху* (Рис. 19) отмечают следующие особенности: скудный, умеренный или обильный, сплошной с ровным или волнистым краем, четковидный, напоминающий цепочки изолированных колоний, диффузный, перистый, древовидный или ризоидный. Характеризуют оптические свойства налета, его цвет, поверхность и консистенцию.

Определение культуральных признаков дрожжей при росте на плотных средах сводится к описанию штриха, изолированной или гигантской колонии.

Культуры по консистенции бывают чаще всего пастообразными, а также слизистыми, почти полностью стекающими на дно пробирки, вязкими и клейкими, плотными густыми, кожистыми или крошащимися.

Слизистым ростом характеризуются в основном *Lipomyces*, *Cryptococcus* и некоторые виды *Hansenula* со шляповидными спорами, тогда как для видов, образующих истинный и ложный мицелий, например *Candida*, более обычен рост в виде плотного складчатого штриха с ворсинчатым окаймлением. Край хорошо просматривается визуально при просвечивании пробирки или чашки, а также при наблюдении под малым увеличением микроскопа.

Цвет штриха или колоний зависит от образования дрожжами некоторых пигментов. Наличие желтых, оранжевых и красных пигментов, не проникающих в среду, характерно для *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* и некоторых видов *Cryptococcus*. Образование кирпично-красного пигмента пульхерримина, диффундирующего в агар специфично для *Metschnikowia pulcherrima*. Подавляющее большинство видов дрожжей не синтезирует пигментов и формирует колонии бесцветные или слегка кремового или коричневого оттенка при старении. Такого рода колонии характерны для дрожжей рода *Saccharomyces*.

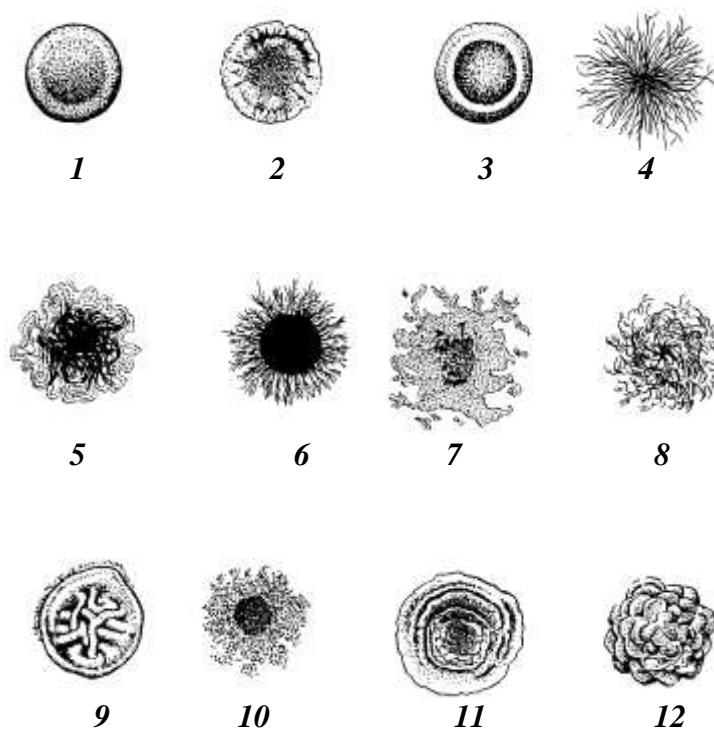


Рис. 17. Форма колонии.

1 – круглая; 2 – круглая с фестончатым краем; 3 – круглая с валиком по краю; 4 – ризоидная; 5 – ризоидная; 6 – с ризоидным краем; 7 – амёбовидная; 8 – нитевидная; 9 – складчатая; 10 – неправильная; 11 – концентрическая; 12 – сложная.

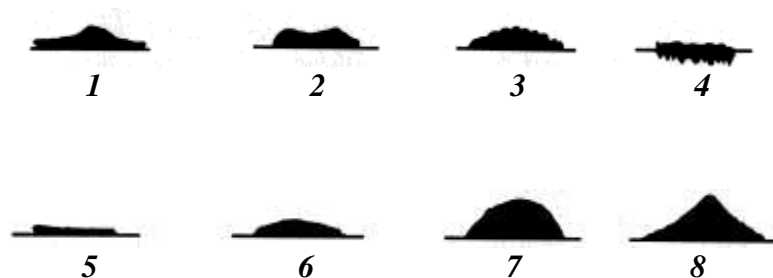


Рис. 18. Профиль колонии.

1 – изогнутый; 2 – кратерообразный; 3 – бугристый; 4 – врастающий в субстрат; 5 – плоский; 6 – выпуклый; 7 – каплевидный; 8 – конусовидный.

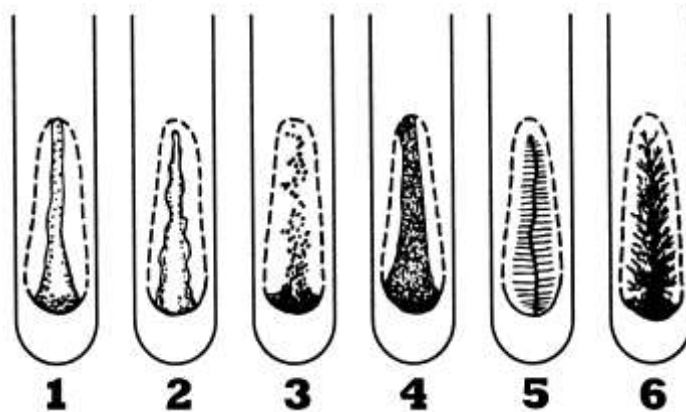


Рис. 19. Рост по штриху.

1 – сплошной с ровным краем; 2 – сплошной с волнистым краем;
3 – четковидный; 4 – диффузный; 5 – перистый; 6 – ризоидный.

Розоватая окраска штрихов у некоторых видов *Hansenula* и *Pichia* может быть связана с обильным спорообразованием, а колонии *Nadsonia* или *Lipomyces* становятся коричневыми вплоть до шоколадного цвета при образовании аскоспор. Появление меланиноподобного пигмента, от которого штрих приобретает цвет от темно-зеленого до угольно-черного, характерно для *Phaeococcus* и дрожжеподобных грибов рода *Aureobasidium*, которые на ранних стадиях роста могут давать неокрашенные штрихи, не отличимые от других дрожжей.

Для получения стандартного штриха используют две среды: сусло-агар концентрацией 8 – 10% СВ и глюкозо-пептонный агар с дрожжевым экстрактом. Посев производят прямым штрихом в пробирки со скошенным агаром, в чашки Петри или маленькие колбочки.

Рост описывают через 6 – 8 суток инкубации 25 – 30°C, а в случае медленно растущих культур через 8 суток делают первое описание, а затем через 6 недель просматривают и описывают культуры вторично. Длительное выращивание производят при комнатной температуре – 17 – 18°C.

Для получения гигантской колонии используют сусло с желатиной (20 %) или морфологический агар.

Среды стерилизуют в маленьких колбочках и закашивают. Посев производят легким уколом иглы в центр скошенной поверхности.

Для фотографирования посев лучше делать в чашках Петри с толстым слоем агара. Выращивают в течение 30 суток при комнатной температуре.

Для замедления высыхания агара колбочки сверху обвязывают полиэтиленовым колпачком, а чашки Петри заклеивают сбоку лентой или пластырем.

При описании отмечают диаметр колонии и все признаки, указанные для штриха. Кроме того, при необходимости, обращают внимание на разжижение желатины.

При использовании в диагностических целях культуральных признаков дрожжей следует учитывать, что разные штаммы одного вида на плотных средах могут давать различные формы роста: шероховатые (**R** - *rough*) и гладкие (**S** - *smooth*), матовые (**M** - *mat*) и блестящие глянцевые (**Q** - *glossy*).

Рост в жидких средах.

Рост микроорганизмов в жидких питательных средах более однообразен и сопровождается помутнением среды, образованием пленки или осадка. Характеризуя рост микроорганизмов в жидкой среде, отмечают;

степень помутнения – слабая, умеренная или сильная;

особенности пленки – тонкая, плотная или рыхлая, гладкая или складчатая, опускающаяся или поднимающаяся по стенкам пробирки;

образование осадка – скудный он или обильный, плотный, рыхлый, слизистый или хлопьевидный.

Нередко рост микроорганизмов сопровождается появлением запаха, пигментацией среды, выделением газа. Последнее обнаруживают по образованию пены, пузырьков, а также с помощью поплавков.

Для описания характера роста микроорганизмов в жидких средах их выращивают на среде, обеспечивающей хороший рост.

При росте в жидких средах дрожжи вызывают помутнение, образуют осадок, кольцо или разного характера пленки. Рост в виде пленки характеризует способность клеток объединяться в мицелиальные структуры. При образовании истинного мицелия пленка обычно толстая и плотная, но в старых культурах она может превращаться в слизистую массу. Раннее, через 1 – 2 дня, образование тонкой тусклой, иногда мелкоморщинистой и всплывающей по стенкам пробирки пленки обычно наблюдается у дрожжей с окислительным типом энергетического метаболизма.

Рост дрожжей в жидких средах наблюдают и описывают при использовании солодового сусле концентрацией 10 – 15% СВ или в жидкой глюкозо-пептонной среде с дрожжевым экстрактом. Посев делают в пробирки или колбочки Эрленмейера и инкубируют 4 недели при комнатной температуре – 17 – 18°C.

Выделение чистой культуры.

Источником чистой культуры дрожжей могут быть лабораторные коллекционные культуры, производственные субстраты и естественные экологические ниши.

Чистой микробной культурой называют популяцию, представляющую собой потомство одной или нескольких клеток одного вида микроорганизма.

Каждый новый изолят носит название *штамма*, которому присваивают буквенное или номерное обозначение.

Расами называют производственные штаммы одного вида дрожжей, различающиеся между собой по степени проявления физиологической активности.

В генетических исследованиях пользуются так называемыми **клонами** – чистыми культурами, полученными от одной споры или гаплоидной клетки.

Основной задачей при исследовании любого материала является получение чистой культуры, т.е. изолированных колоний тех организмов, которые находятся в субстрате. При этом важнейшим условием успешной работы является правильный выбор последовательности ее выполнения и подбор необходимых питательных сред.

Существуют прямые и непрямые методы получения чистых культур дрожжей. Первые основаны на выделении одной клетки или споры под непосредственным контролем через микроскоп. Во втором случае используют косвенные приемы для разделения клеток.

Прямые методы.

Капельный способ Линднера.

Суспензию дрожжей разбавляют жидким сушлом до концентрации ≈ 100 клеток в 1 мл и стерильным чертежным пером наносят мельчайшие капельки на необезжиренное покровное стекло, простерилизованное фламбированием в пламени горелки. Капельки располагают в определенном порядке, обычно по пять капель в два ряда, т. е. всего 10 капель на стекле. Затем быстро опрокидывают стекло над влажной камерой, которую запечатывают минеральной смазкой. Все капли немедленно просматривают под микроскопом и отмечают те из них, которые содержат по одной единственной клетке. Если все капли содержат по несколько клеток, то увеличивают разбавление суспензии и процедуру повторяют. После трех-четырехдневного инкубирования, когда отмеченные единичные клетки образуют микроколонии, последние переносят стерильной иглой или полоской стерильной фильтровальной бумаги в жидкую среду и инкубируют.

Метод Линднера, упрощенный Вучковичем.

Видоизменение Вучковичем метода Линднера сводится к тому, что капельки суспензии, содержащие 3 – 4 клетки дрожжей, снимают петлей, которой предварительно захватывают стерильную среду, и переносят штрихом на поверхность плотной среды. Через некоторое время появляются микроколонии, число которых на одном штрихе должно соответствовать количеству исходных клеток в отмеченной капельке.

Из этих колоний пересевом выделяют чистые культуры. Таким способом можно сразу получить несколько одноклеточных культур за короткое время.

Выделение спор дрожжей при помощи микроманипулятора.

К использованию микроманипулятора прибегают главным образом при необходимости изолировать споры из асков, так как вегетативные клетки легко повреждаются при микроманипулировании.

Аски разрывают либо механическим прикосновением игл микроманипулятора, либо заранее обрабатывая суспензию препаратом ферментов (например, из пищеварительного тракта виноградной улитки *Helix pomatia*), лизирующих клеточную стенку дрожжей.

Непрямые методы.

В эту группу включаются методы, основанные на разделении клеток в питательных средах и использовании специфических биологических особенностей отдельных видов для создания преимущественных условий для их роста.

Основным методом выделения чистых культур микроорганизмов является метод, предложенный Р. Кохом. Принцип его заключается в получении чистой культуры из изолированной колонии.

На поверхность плотных питательных сред из пипетки наносят каплю накопительной культуры или ее разведения в стерильной воде и стерильным стеклянным шпателем Дригальского распределяют каплю по поверхности среды в чашке Петри (Рис. 20). Далее этим же шпателем протирают поверхность среды последовательно во второй, третьей и четвертой чашках. Обычно в первых двух чашках после инкубации наблюдается сплошной рост микроорганизмов, тогда как в последующих – рост изолированных колоний.

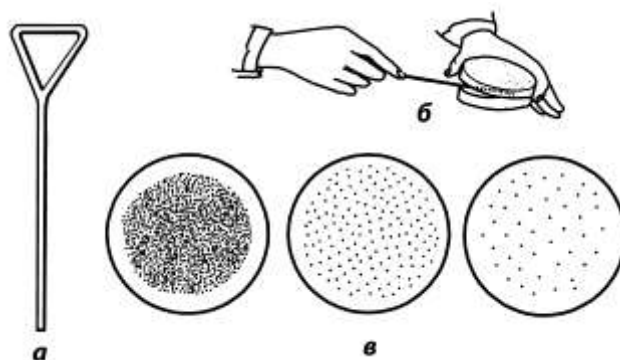


Рис. 20. *Рассев культуры микроорганизмов на поверхность плотной питательной среды шпателем Дригальского.*

а – шпатель Дригальского;

б – рассев;

в – рост микроорганизмов.

Рассевать накопительную культуру можно бактериологической петлей методом истощающего штриха. В этом случае накопительную культуру или ее разведение отбирают петлей и на поверхности плотной среды проводят

штрихи в порядке, указанном на рисунке 21. Перед взятием каждого нового инокулята петлю стерилизуют над пламенем горелки.

После посева чашки Петри помещают в термостат крышками вниз, чтобы конденсационная вода, образовавшаяся на крышке чашки при застывании агара и в последствии при инкубации, не стекала на поверхность среды и не помешала получить изолированные колонии. Чашки выдерживают в термостате в течение 7 – 10 суток при температуре 28 – 30°C.

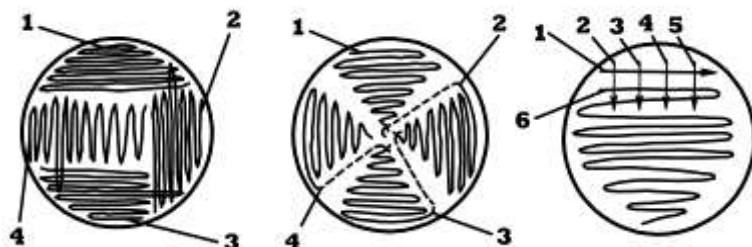


Рис. 21. *Рассев культуры микроорганизмов на поверхность плотной питательной среды бактериологической петлей.*

1 – 6 – последовательность контакта бактериологической петли с поверхностью плотной питательной среды.

С целью сохранения культуры выросшие изолированные колонии отсевают петлей на поверхность скошенного 2,5 %-ого сусло-агара в пробирке или в жидкое неохмеленное сусло (8 % СВ).

Посев на скошенный агар производится бактериологической петлей методом истощающего штриха, начиная со дна пробирки.

Длительное хранение требует особого подбора среды и условий хранения биомассы, при которых культура сохранит свою физиологическую активность.

В зависимости от первичного источника выделения и интенсивности его обсеменения следует принимать решение об использовании накопительных (элективных) сред на стадии посевов первичного материала.

Внесение в питательные среды селективных компонентов, их качественный и количественный состав определяются интенсивностью и биологическим разнообразием обсеменения первоначального субстрата посторонней сопутствующей плесневой, дрожжевой и бактериальной микрофлорой. При выделении дрожжей из сильно загрязненных субстратов и подавления роста сопутствующих микроорганизмов к указанным выше питательным средам добавляют различные ингибиторы селективного действия.

Рост большинства бактерий и актиномицетов подавляется при низком значении pH среды, поэтому чаще всего среды для выделения дрожжей подкисляют до pH 4,5 путем добавления к ним минеральных или органических кислот. Для синтетических сред наиболее применима соляная кислота, для сусловых – молочная, лимонная или винная. Для подкисления солодового сусла (8 % СВ) обычно требуется концентрированной молочной

кислоты 3 – 4 см³/л. Кислоты добавляют в жидкую или расплавленную агаровую среду после стерилизации, непосредственно перед засевом или перед разливкой в чашки Петри.

Вместо кислот используют также антибиотики широкого спектра действия: стрептомицин (80 мг/л или 100 ед/см³), пенициллин (20 – 100 ед/см³), левомецетин (50 мг/л) и др. Их можно добавлять в среду порознь и в комплексе. Например, против кислотоустойчивых бактерий применяют следующие смеси антибиотиков: пенициллин 60 ед/см³ + стрептомицина сульфат 100 ед/см³; левомецетин (хлорамфеникол) 20 мг/л + стрептомицина сульфат 20 мг/л + хлортетрациклин солянокислый 100 мг/л.

Для отделения сахаромецетов от других дрожжей добавляют 2,5% этилацетата и рН до 4,0 доводят уксусной кислотой. Затем чашки герметизируют. При этих условиях колонии сахаромецетов появляются первыми.

Росту дрожжей на питательных средах при высевах из исходного материала зачастую препятствуют грибы с широко распространяющимися по поверхности субстрата мицелиальными колониями. Они имеют общие с дрожжами потребности в источниках питания, устойчивы к низким значениям рН среды и нечувствительны к действию указанных выше противобактериальных антибиотиков. Для ограничения роста микромицетов в среду добавляют специфические вещества: дифенил (0,005 – 0,01%), бычью желчь (0,25 – 0,5%), теллулат калия (0,05 – 0,15%), пропионат натрия (0,15 – 0,25%), или некоторые красители: бромкрезоловый пурпурный (0,0025% или 2,5 см³/л 1% раствора), бенгальский розовый (0,003%), кристаллический фиолетовый (0,001%).

Поскольку дрожжи являются факультативными анаэробами и не требуют особых условий аэрирования, для получения их изолированных колоний посева из накопительной культуры или другого исследуемого материала лучше производить на поверхность 2,5 %-ого сусло-агара и инкубировать в обычных условиях при 28 – 30°C.

Метод отбора наиболее активной культуры.

Стандартный метод.

Пробу исследуемой культуры дрожжей высевают в чашку Петри на сусло-агар. Через 6 – 7 суток выращивания дрожжей в термостате при 30°C из наиболее крупных колоний делают пересевы на косой сусло-агар и одновременный посев одной петли в пробирку с 15 см³ солодового сусла.

Пробирки с посевом ставят в термостат с температурой 30°C. Через 42 – 48 ч сусло осторожно сливают с дрожжевого осадка.

В маленькие пробирки (длина 12 см, диаметр 1,2 см), одинаковые по диаметру, насыпают по 1 г муки, употребляемой для обычной проверки подъемной силы дрожжей.

В пробирки с дрожжевым осадком наливают по 2 см³ нагретой до 30°C водопроводной воды, осадок тщательно взбалтывают в воде петлей диаметром 0,9 см, изготовленной из толстой проволоки, затем дрожжевую суспензию выливают в пробирку с мукой и размешивают до равномерной консистенции. Верхний уровень этой мучной болтушки отмечают восковым карандашом, все пробирки ставят в термостат при 30°C.

Через каждые 15 мин вынимают пробирки, быстро отмечают новый уровень подъема жидкого теста и обычной линейкой замеряют высоту подъема от первой отметки до второй. Наблюдение длится 60 минут.

Предлагаемую в качестве примера таблицу 9 можно использовать для регистрации полученных результатов.

Таблица 9

Активность исследуемой культуры

Номер колонии	Подъем жидкого теста (см) при 30°C (мин).			
	15	30	45	60
1				
2				
3				
4				

Если дрожжи из отмеченной по лучшему подъему колонии имеют также лучшие показатели по микроскопии (клетки однородные, примеси посторонних микроорганизмов нет), то эту пробирку с колониями на косом сусло-агаре используют для посевов при выпуске следующей генерации чистой культуры дрожжей.

Модифицированный метод отбора наиболее активной культуры.***

Производственную или коллекционную культуру дрожжей высевают на чашку Петри с 2,5 %-ным сусло-агаром и инкубируют при 30°C в течение 72 – 96 ч. По окончании инкубации выбирают 3 – 5 наиболее крупных колоний, характер роста и морфология клеток которых соответствуют исследуемой расе. Из каждой колонии одновременно делают пересевы на скошенный сусло-агар и в колбу с 50 см³ солодового сусла плотностью 8 % СВ. Оба посева инкубируют при 30°C в течение 72 ч. Культуру на скошенном агаре

хранят до окончания эксперимента при 2 – 4°C, а культуру на сусле используют для проведения анализа.

В заранее взвешенные с точностью до 0,01 г, градуированные центрифужные пробирки разливают по 10 см³ тщательно перемешанной жидкой культуры дрожжей. Центрифугируют 15 мин при частоте вращения 2000 об/мин, после чего сливают надосадочную жидкость и снова взвешивают пробирку с осажденной дрожжевой биомассой. По разнице второго и первого взвешиваний определяют массу осажденных дрожжей в каждой пробирке. Для дальнейшей работы отбирают две из них с наибольшим количеством биомассы с целью постановки параллельных проб. Исходя из полученных результатов, рассчитывают количество необходимых ингредиентов – муки пшеничной 1 -го сорта и воды.

Полученная масса отпрессованных в центрифуге дрожжей должна составить 2 % к массе используемой в эксперименте муки и 1 % к объему воды, т. е. на каждые 0,01 г дрожжей вносят 0,5 г муки 1-го сорта и 1 см³ воды.

Далее в градуированную пробирку объемом 25 мл вносят необходимое количество муки.

В центрифужную пробирку с осажденными дрожжами добавляют необходимое количество воды и тщательно перемешивают до однородной суспензии, которую сразу переносят в пробирку с мукой.

Петлей из толстой проволоки смесь перемешивают до получения равномерной мучной болтушки, после чего регистрируют ее первоначальный объем.

Полученные таким образом пробы помещают в термостат при 30°C. Наблюдение ведут в течение 90 мин, при этом каждые 15 мин регистрируют уровень подъема жидкого теста.

По окончании инкубирования рассчитывают отношение объема жидкого теста на каждый момент регистрации к его первоначальному объему. Среднее арифметическое между полученными результатами считают показателем активности выбранной культуры.

Такой метод учета результатов позволяет проследить динамику подъема жидкого теста, которая может различаться у культур при одинаковом объеме теста на конец опыта.

Лучшей считается проба с наибольшей средней величиной шести зарегистрированных показателей подъема теста, а культура, используемая для этой пробы, – наиболее активной.

Выбор наиболее активной культуры манометрическим методом.***

Для проведения анализа необходимо собрать несложный прибор, состоящий из бродильного сосуда (100 – 120 см³), медицинского anerоидного манометра и газоотводной трубки с краником (Рис. 22). Перед началом работы следует точно измерить внутренний объем прибора V_1 , величина которого в дальнейшем будет использоваться как «постоянная».

Производственную или коллекционную культуру дрожжей пересеять на чашку Петри с 2 %-ным сусло-агаром и инкубировать при 30°C в течение 96 – 120 ч. По окончании инкубации выбрать 3 наиболее крупные колонии, характер роста и морфология клеток которых соответствуют исследуемой расе.

Каждую из выбранных колоний рассеять на скошенный агар и 2 чашки Петри, при этом на поверхность агара в чашках перенести большую часть колонии для получения в них сплошного роста.

Все посевы инкубировать при 30°C в течение 120 – 140 ч.

Культуру на скошенном агаре хранить до окончания эксперимента при 2 – 4°C. Дрожжевую биомассу, полученную в чашках Петри, использовать для анализа.

Полученный в чашках сплошной слой дрожжей снять с поверхности агара шпателем и отвесить 0,5 г. Биомассу перенести в 10 см³ физиологического раствора температурой 30°C и размешать до получения однородной суспензии, которую сразу перелить в бродильный сосуд. Туда же добавить 10 см³ 8 – 10 %-ого солодового сусла и герметично закрыть резиновой пробкой с газоотводной трубкой. Свободный конец трубки соединить гибким шлангом с манометром. Для уравнивания давления в сосуде с атмосферным давлением извлечь подвижную часть краника и сразу вернуть его на место, тщательно притерев и совместив отверстия.

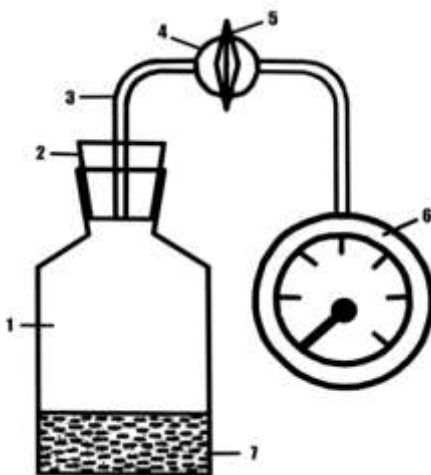


Рис. 22. *Схема прибора для проведения анализа.*

1 – колба; 2 – резиновая пробка; 3 – газоотводная трубка; 4 – краник; 5 – подвижная часть; 6 – манометр; 7 – дрожжевая суспензия.

Подготовленный таким образом прибор поместить в термостат при 30°C (303 К) и регистрировать время, за которое стрелка манометра достигнет необходимой отметки, соответствующей 10 см³ выделенного углекислого газа.

Соответствующее этим условиям показание манометра рассчитать по формуле:

$$P_x = \frac{m R T}{V_x M}$$

где

P_x – показание манометра;

$m = 0,016$;

$R = 62360$ мм рт. ст./моль К;

$T = 303$ К;

$M = 44$ г;

$V_x = V_1 - 20,5$ см³ (объем суспензии).

Подставив значения в формулу, определить давление, создаваемое газом массой 0,016 г и объемом 10 см³ в используемом объеме V_x при температуре T .

Время, за которое стрелка манометра достигнет определенной по формуле величины, считать показателем активности.

Лучшей считать культуру, затратившую минимальное время на выделение 10 мл углекислого газа, а значит, обладающую более высокой ферментативной активностью.

Окончательное решение принимать только с учетом культуральных и морфологических свойств исследуемой культуры.

Хранившуюся на скошенном агаре дублирующую культуру, показавшую лучшие результаты, использовать для разводочного цикла.

Жизнеспособность дрожжей.

Наиболее простым для проверки жизнеспособности дрожжевых клеток в суспензии является метод с использованием метиленового синего. Этот метод обусловлен тем, что метиленовый синий благодаря дыхательной активности клеток быстро редуцируется и теряет окраску. При отмирании клетки становятся более проницаемы для метиленового синего и при отсутствии дыхательной активности цвет остается синим. Таким образом, метиленовый синий указывает на отсутствие у клеток дыхательного метаболизма, а не на их гибель как таковую, причем существует возможность, что некоторые метаболически активные клетки оказываются не способными к размножению, в связи с чем они будут отнесены к мертвым.

Если число жизнеспособных клеток превышает 90 %, этим можно пренебречь, но при снижении числа таких клеток менее чем до 90 % эта погрешность становится все более значимой. Общее количество клеток в

1 см³ и количество «синих» клеток измеряется в камере для подсчета. Для измерения процента жизнеспособных клеток с точностью 0,5 % необходимо насчитать не менее 200 клеток. Для получения большей точности необходимо наличие не менее 600 клеток, причем не менее чем в двух отдельных пробах. Использовать два отдельных анализа следует потому, что среднее из двух результатов обеспечит большую точность результатов.

Другие красители дают лучшие результаты – например, метиленовый фиолетовый.

Как бы то ни было, в настоящее время общепризнано, что информация о проценте жизнеспособных клеток не позволяет гарантировать приемлемое состояние засевных дрожжей. Термин «жизнеспособность» отражает способность дрожжей к быстрому и эффективному сбраживанию, а не состояние «быть живым».

Жизнеспособность дрожжей по степени окисления.

В качестве индикаторов жизнеспособности предложены самые разные методы, включая содержание гликогена, АТФ или стерола, образование СО₂ или потребление О₂ из раствора глюкозы, а также скорость выделения определенных ионов.

Наиболее удобным методом для определений, которые должны быть выполнены в кратчайшее время, является выделение ионов Н⁺, то есть снижение значения величины рН, при введении дрожжей в сбраживаемый субстрат.

Для определения жизнеспособности дрожжей по степени окисления дрожжи промывают центрифугированием и затем тщательно перемешивают в 100 см³ дистиллированной воды. Через 10 мин добавляют 5 см³ 20 %-ого (масс/об) раствора глюкозы и перемешивают еще 10 мин. В ходе инкубации в течение 20 мин каждую минуту измеряют рН суспензии. Резкое снижение значения рН сразу же и после добавления раствора глюкозы до < 4 свидетельствует об активности дрожжей, а степень окисления коррелирует с изменением величины рН.

Как и метод с использованием метиленового синего, данный метод достаточно быстр и позволяет получить результаты до внесения дрожжей.

Определение количества мертвых клеток.

Дифференциальное окрашивание метиленовым синим.

Около 1 г сухих дрожжей вносят в пробирку со стерильным солодовым сушлом плотностью 8 % видимых СВ.

Пробирку ставят в термостат при температуре 30°C на 4 часа. За это время все живые клетки, содержащиеся в пробе, выходят из состояния анабиоза и начинают почковаться. Из подмоложенных таким способом

дрожжей готовят препарат, который окрашивают метиленовым синим, приготовленным на буферной смеси.

Для прессованных дрожжей и живой культуры нет необходимости в такой процедуре.

Каплю взвеси дрожжей смешивают с каплей синьки на предметном стекле и накрывают покровным стеклом. Мертвые клетки окрашиваются, а живые остаются неокрашенными. В пяти полях зрения отдельно подсчитывают количество мертвых и живых клеток, процент мертвых клеток вычисляют по отношению ко всему количеству клеток. Материнскую клетку с неотделившейся почкой принимают за одну клетку.

Люминесцентный метод.

Используют люминесцентный микроскоп или люминесцентный осветитель и флуорохром примулин.

Краситель готовят в виде двух растворов: водный раствор (1:20000) и раствор (1:20000) в фосфатном буфере pH 8 – 9. Оба раствора хранят в темноте.

Предметные и покровные стекла тщательно обезжиренные.

При микроскопировании белых вин бактериологической петлей помещают на предметное стекло каплю осадка и рядом каплю водного раствора примулина, смешивают их и накрывают покровным стеклом, на которое затем наносят каплю нелюминесцирующего иммерсионного масла.

При микроскопировании красных вин (в связи с гашением люминесценции) красный цвет необходимо устранить, что достигается созданием в препарате щелочной среды. Красный цвет вина при этом превращается в синий.

Бактериологической петлей помещают на предметное стекло каплю осадка вина и две капли раствора примулина в фосфатном буферном растворе pH 8 – 9. Капли тщательно смешивают петлей в течение 1 – 2 мин, затем накрывают покровным стеклом, на которое помещают каплю нелюминесцирующего иммерсионного масла.

Приготовленные препараты рассматривают в люминесцентном микроскопе в фиолетовой и синей видимой частях спектра. Для этого пользуются светофильтрами: синим, сине-зеленым, белым и запирающим желтым.

Сначала препарат рассматривают в проходящем свете и подсчитывают общее количество микроорганизмов, а затем – в свете люминесценции, подсчитывая только количество мертвых клеток.

В свете люминесценции живые микроорганизмы не видны, иногда у дрожжевых клеток светится только оболочка в виде тонкого зеленого кольца. Мертвые дрожжи и бактерии в свете люминесценции светятся зеленым и желтым светом разной интенсивности.

При подсчете микроорганизмов необходимо учитывать разведение исследуемого материала в 2 раза для белых вин и в 3 раза – для красных.

Метод эпифлуоресценции.

Методика позволяет определять количество жизнеспособных клеток дрожжей в винах и других сброженных материалах, содержащих их небольшое количество (в момент розлива в бутылки) с использованием эпифлуоресценции и сравнивается с контрольным методом (подсчет колоний на питательной среде).

Применяют также красители-флуорохромы и люминесцентный микроскоп.

Препарат готовят на мембранах Миллипор из поликарбоната диаметром 13 мм – 25 мм или из ацетилцеллюлозы диаметром 45 мм.

Испытуемое вино фильтруют под вакуумом через мембраны, окрашивают и подсчитывают под микроскопом число клеток в см³ с учетом числа клеток и подсчитанных полей, площади фильтрующей мембраны, площади полей микроскопа, объема отфильтрованного образца, числа наблюдаемых полей.

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 мембранных 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 посева на питательные среды дает возможность определить только число жизнеспособных клеток в популяции.

Поскольку сред, пригодных для роста всех микроорганизмов, не существует, метод посева 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 завесить число микроорганизмов в исследуемом субстрате.

Методы микроскопирования.

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. 23). 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 – $1/25 \text{ мм}^2$, площадь малых квадратов – $1/400 \text{ мм}^2$. 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.

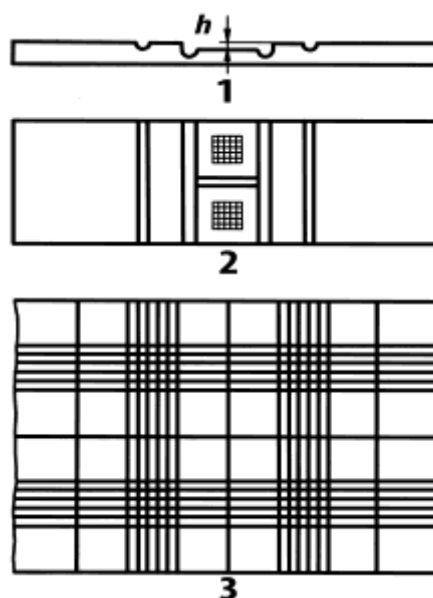


Рис. 23. Счетная камера Горяева — Тома.

1 – вид сбоку; 2 – вид сверху; 3 – при малом увеличении микроскопа;

h – глубина камеры.

Число клеток подсчитывают с объективом 40[×]. 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.

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:

$$M = \frac{a \cdot 1000}{h S} \cdot n,$$

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.

Капиллярный метод прямого счета микроорганизмов.

Для подсчета микроорганизмов Б.В.Перфильевым были разработаны специальные многоходовые счетные капилляры с плоскими параллельными стеклами. Они имеют прямоугольное сечение и по принципу подсчета аналогичны счетной камере, их глубина и ширина определяются конструкцией капилляра и представляют известные величины, а длина обычно соответствует диаметру поля зрения микроскопа или может быть измерена. В отличие от камеры Горяева в капиллярах Перфильева можно использовать объективы с большим увеличением, в том числе иммерсионные, что позволяет подсчитывать мелкие микроорганизмы. Поэтому такие капилляры в принципе могут применяться для подсчета микробных клеток и контроля роста бактерий в промышленной, пищевой, а также медицинской микробиологии. Многоходовые капилляры представляют собой конструкцию из нескольких (обычно 5) параллельных капиллярных ячеек, смонтированных на специальном предметном стекле. Клетки

микроорганизмов подсчитывают в каждой капиллярной ячейке, а для дальнейших расчетов используют усредненное число.

При погружении капилляра в субстрат он заполняется им в силу своих капиллярных свойств. Затем заливают конец капилляра расплавленным парафином, что позволяет предохранить содержимое капилляра от высыхания, помещают его на предметное стекло, и подсчитывают клетки, используя объективы 40[×], 90[×] или фазово-контрастное устройство.

Для получения достоверного результата подсчитывают клетки в 50 – 100 полях зрения, подсчет ведут во всех капиллярах. Количество клеток в 1 см³ исследуемого субстрата определяют по формуле:

$$M = \frac{a \cdot 1000}{h \cdot l \cdot d} \cdot n,$$

где

- M*** – количество клеток в 1 см³ суспензии;
- a*** – среднее количество клеток в капилляре длиной в диаметр поля зрения;
- h*** – глубина капилляра, мм;
- l*** – ширина капилляра, мм;
- d*** – диаметр поля зрения (длина капилляра) при данном увеличении микроскопа, мм;
- 1000*** – коэффициент перевода см³ в мм³;
- n*** – степень разведения исследуемой суспензии.

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[×].

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^3 исследуемой суспензии вычисляют по формуле:

$$M = \frac{a \cdot 1000}{h \cdot S} \cdot n \cdot 2,$$

где

- M – количество клеток в 1 см^3 суспензии;
- a – среднее количество клеток в квадрате сетки;
- h – высота камеры, мм;
- S – площадь квадрата сетки, мм^2 ;
- 1000 – коэффициент перевода см^3 в мм^3 ;
- n – степень разведения исследуемой суспензии;
- 2 – разведение раствором синьки.

Результаты счета можно фиксировать в предлагаемой в качестве примера таблице 10.

Таблица 10

Характеристика клеток дрожжевой взвеси

<i>Время брожения (часы /сутки)</i>	<i>Общее кол-во клеток (млн/мл)</i>	<i>Кол-во почк-ся клеток (млн/мл)</i>	<i>Кол-во мертвых клеток (млн/мл)</i>	<i>% почк-ся клеток</i>	<i>% мертвых клеток</i>	<i>Средний размер клеток</i>

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 эритрозином, 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: $S = \pi r^2$.

Подсчет клеток на мембранных фильтрах.

Данный метод рекомендуется использовать для определения численности микроорганизмов в субстратах с низкой плотностью клеток. Его применяют при определении количества микроорганизмов в различных водоемах, при санитарно-бактериологических и некоторых других исследованиях. Фильтрация пробы известного объема (от нескольких миллилитров до литров) позволяет сконцентрировать на поверхности фильтра содержащиеся в пробе клетки микроорганизмов. Затем их окрашивают и подсчитывают.

Для фильтрации выбирают фильтр, размер пор которого позволяет задерживать микроорганизмы, находящиеся в субстрате. Перед использованием фильтры кипятят в дистиллированной воде для удаления воздуха и остатков растворителей; воду следует 2 – 3 раза сменить (кипячение не должно быть слишком бурным, иначе фильтры будут скручиваться). Затем фильтр помещают на специальный держатель матовой стороной вверх и пропускают через него точно измеренный объем пробы.

Чем больше плотность клеток в исследуемом материале, тем меньше должен быть исследуемый объем, и наоборот. Клетки микроорганизмов, осевшие на фильтре, окрашивают карболовым эритрозином. Для этого фильтр помещают нижней стороной в чашку Петри на фильтровальную бумагу, увлажненную красителем, чашку закрывают крышкой и оставляют на 3 – 5 ч или на сутки. Для равномерного окрашивания клеток мембранный фильтр должен плотно прилегать к бумажному фильтру с эритрозином. Затем мембранный фильтр отмывают от красителя, перекладывая его в чашки Петри с фильтровальной бумагой, обильно смоченной дистиллированной водой, до тех пор, пока он не перестанет ее окрашивать. После отмывания фильтр высушивают на воздухе и готовят препарат для микроскопии. На предметное стекло наносят каплю иммерсионного масла и помещают на него окрашенный мембранный фильтр так, чтобы клетки микроорганизмов были сверху. На поверхность мембранного фильтра наносят еще каплю иммерсионного масла и покрывают фильтр покровным стеклом.

Количество клеток микроорганизмов подсчитывают с иммерсионным объективом 90[×] в квадратах окулярной сетки или в поле зрения микроскопа. Правила подсчета аналогичны тем, которые изложены для метода Виноградского–Брида. Количество клеток в 1 см³ исследуемого субстрата вычисляют по формуле:

$$M = \frac{a \cdot F \cdot 10^6}{S \cdot V},$$

где

- M* – количество клеток в 1 см³ исследуемого субстрата;
a – среднее количество клеток в квадрате окулярной сетки (поле зрения);

- F – площадь мембранного фильтра, мм²;
 s – площадь квадрата окулярной сетки (поля зрения), мм²;
 V – объем профильтрованной жидкости, см³;
 10^6 – коэффициент перевода мм² в мкм².

При выявлении и количественном учете микроорганизмов широко применяют люминесцентную микроскопию. Препараты микроорганизмов готовят непосредственно из исследуемой суспензии или ее разведения либо концентрируют клетки на специально обработанных нефлуоресцирующих фильтрах. Препараты и фильтры с микроорганизмами обрабатывают акридиновым оранжевым или другими флуоресцирующими красителями. Принципы подсчета при светлостольной и люминесцентной микроскопии одинаковы, однако окрашенные флуорохромами клетки более четко видны на темном фоне препарата, их легче отличить от небиологических объектов и произвести подсчет более точно.

Люминесцентная микроскопия дает также возможность выявить и оценить в исследуемой пробе численность отдельных групп микроорганизмов. Для этого применяют специальные флуорохромы (например, калькофлуор белый – для выявления грибов), метод иммунофлуоресценции и др.

Методы посева на питательные среды.

Определение количества клеток посевом 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 колониеобразующих 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.

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 см³ 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.

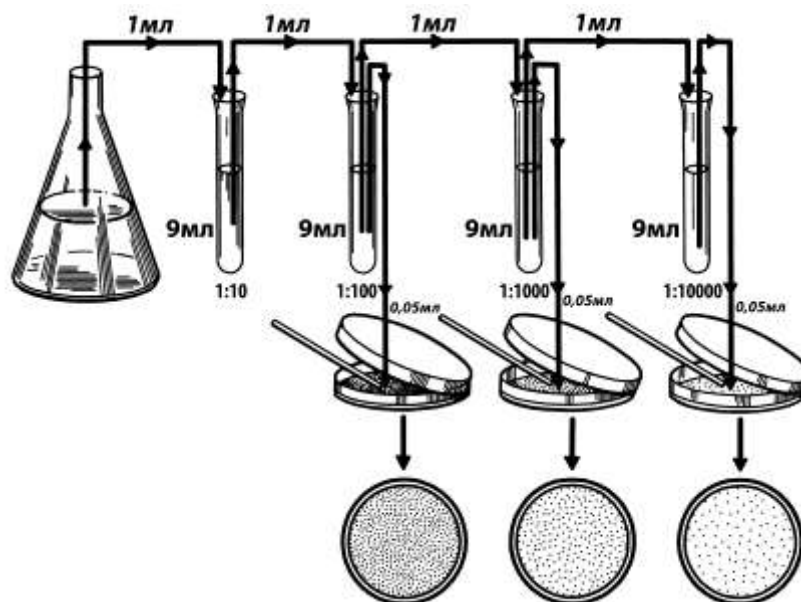


Рис. 24. *Схема приготовления разведений и посева суспензии микроорганизмов.*

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, но

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 см³ 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 микроорганизмов 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 освещать.

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 чашке 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 высевок из одного и того же разведения суммируют и определяют среднее число колоний на одной чашке.

Количество клеток в 1 см³ исследуемого субстрата вычисляют по формуле:

$$M = \frac{a \cdot 10^n}{V},$$

где

- M* – количество клеток в 1 см³ исследуемого субстрата;
a – 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. Рекомендуются сразу же делать фотографии 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 *n* 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 см³ 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.

Определение количества клеток с использованием прибора вакуумной фильтрации.

Устройство прибора и порядок работы с ним.

При необходимости количественного учета микроорганизмов приоритетным является использование приборов вакуумной фильтрации отечественного и импортного производства. При некоторых различиях, все они устроены по одному принципу.

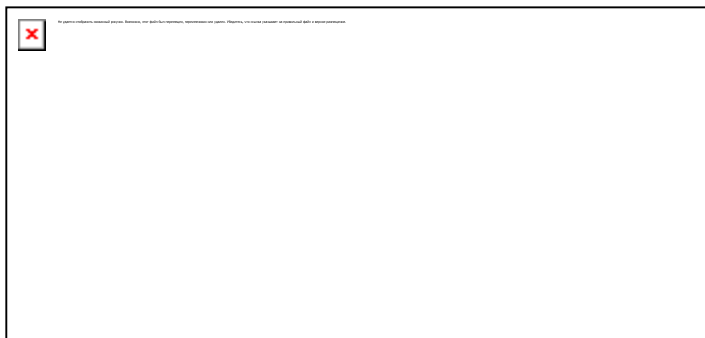


Рис. 25. *Принципиальная схема прибора вакуумной фильтрации.*
1 – фильтродержатель с воронками (1, 3 или 6-секционный коллектор);
2 – колба Бунзена;
3 – фильтрующий блок Мидисарт;
4 – вакуумный насос;
5 – резиновый шланг.

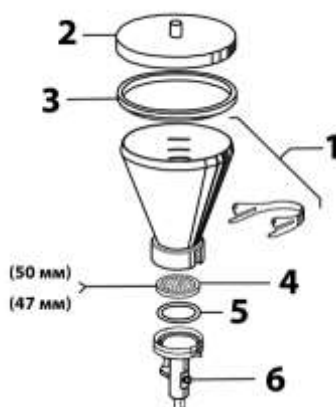


Рис. 26. *Принципиальная схема сборки фильтрующего узла.*
1 – воронка с запорной скобой;
2 – крышка;
3 – силиконовое кольцо;
4 – фритта из нержавеющей стали;
5 – силиконовая прокладка;
6 – кран.

Каждая фильтрационная система состоит из коллектора с 3 или 6 приваренными фильтровальными столами, укомплектованными плоским кольцом из политетрафторэтилена под фриттой из высококачественной стали, служащей в качестве опоры фильтра, и краном из высококачественной стали для регулирования вакуума в каждой отдельной фильтрационной воронке. Каждая воронка оснащена рычажным затвором для надежного крепежа на фильтровальный стол и крышкой с силиконовой уплотнительной прокладкой.

Воронка из высококачественной стали (объем 500 см³) имеет на внутренней стенке вытравленные маркировки на объемы 100, 200, 300, 400 и 500 см³. Воронка из высококачественной стали (объем 100 см³) имеет на внутренней стенке вытравленные маркировки на объемы 50 и 100 см³.

Фирма **Sartorius** производит приборы вакуумной фильтрации с полным набором сопутствующих материалов (фильтры, картонные подложки), предназначенных для решения задач микробиологического анализа в различных отраслях пищевой промышленности.

Безусловными их преимуществами являются: экономия времени при обычных исследованиях – можно одновременно фильтровать 3 или 6 проб; стабильность результатов; практичность и удобство в обращении; независимая регулировка вакуума для каждого отдельного фильтрационного узла.

Микробиологические исследования с использованием прибора вакуумной фильтрации производятся в следующем порядке:

1. Очистить и продезинфицировать лабораторный стол.
2. Расположить в ряд стерильные питательные среды или подготовленные питательные картонные подложки в чашках Петри. Положить рядом стерильно упакованные мембранные фильтры.
3. Поставить рядом с фильтрационной установкой горелку Бунзена, стакан с небольшим количеством спирта и пинцет.
4. Включить источник вакуума (электрический или водоструйный насос) и снять с коллектора воронку.
5. Опалить пламенем фильтровальный стол (металлическую фритту). Открыть кран и провести пламя через фритту. Закрыть кран.
6. Взять воронку и опалить ее снизу.
7. Поместить металлическую воронку на фильтровальный стол и опалить ее внутреннюю часть снизу вверх, проводя пламя по спирали.
8. Опалить крышку и установить ее. Теперь этот фильтровальный узел стерильен. Остальные фильтровальные узлы подготавливаются таким же образом.
9. Взять стерильный мембранный фильтр плоским пинцетом, который также необходимо кратковременно обжечь; свободной рукой снять

металлическую воронку с крышкой и положить мембранный фильтр по центру на фритту.

10. Поместить воронку на фильтровальный стол и закрыть скобы. Таким же образом подготовить все 3 (или 6) фильтрационных узлов.
11. После заполнения пробами каждой воронки открыть краны и фильтровать.
12. После окончания фильтрации закрыть краны. Стерильным пинцетом поочередно перенести фильтры с поверхности фритты на смоченные питательные картонные подложки или питательные среды.
13. После этого чашки Петри поместить в термостат и выдержать согласно предписаниям.

Перед первым вводом в работу и после каждого употребления систему нужно прочищать и высушивать. При этом она сначала промывается горячей водой, а затем ополаскивается дистиллированной водой. При сильном загрязнении система дополнительно прочищается имеющимися в продаже лабораторными средствами для очистки (металла, стекла, пластмассы) и мягкими щетками.

При поставке краны уже смазаны консистентной смазкой (используется "высоковакуумная тяжелая консистентная смазка"). Впоследствии следует снимать, чистить, сушить, смазывать и снова монтировать краны только в случае затруднений при открывании и закрывании их. Нужно обязательно следить за тем, чтобы каждый кран был снова вставлен в то же шлифованное коническое гнездо, из которого он был вынут.

После частого употребления зажимные скобы утрачивают зажимную способность, и может быть нарушена герметичность. В этом случае необходимо подтянуть зажимную скобу легким сжиманием плоскогубцами.

Подвижные части, подверженные трению из-за открывания и закрывания, должны всегда быть слегка смазаны.

Стерильные мембранные фильтры.

Такие фильтры уже давно стали стандартом в повседневном микробиологическом контроле качества.

Мембранные фильтры ***Sartorius*** соответствуют международным нормам. Фильтры поставляются готовыми к использованию и избавляют пользователя от процедуры стерилизации. Так как они индивидуально упакованы, риск контаминации даже уже открытых фильтров крайне низок, что подтверждается сертификатом GLP. Согласно требованиям GLP, каждый фильтр имеет идентификационный номер и номер серии на индивидуальной упаковке (Табл. 11).

Характеристика стерильных мембранных фильтров Sartorius

Белые фильтры с черной сеткой, тип 114, стерильные, для обнаружения микроорганизмов на окрашенных средах			
Размер пор 0,2 мкм	Номер	Диаметр	Упаковка, шт
	11407-47-ACN	47 мм	100
	11407-47-ACR	47 мм	1000
	11407-50-ACN	50 мм	100
	11407-50-ACR	50 мм	1000
Размер пор 0,45 мкм	Номер	Диаметр	Упаковка, шт
	11406-47-ACN	47 мм	100
	11406-47-ACR	47 мм	1000
	11406-50-ACN	50 мм	100
	11406-50-ACR	50 мм	1000
Размер пор 0,65 мкм	Номер	Диаметр	Упаковка, шт
	11405-47-ACN	47 мм	100
	11405-50-ACN	50 мм	100
Размер пор 0,8 мкм	Номер	Диаметр	Упаковка, шт
	11404-47-ACN	47 мм	100
	11404-47-ACR	47 мм	1000
	11404-50-ACN	50 мм	100
Размер пор 1,2 мкм	Номер	Диаметр	Упаковка, шт
	11403-47-ACN	47 мм	100
	11403-47-ACR	47 мм	1000
	11403-50-ACN	50 мм	100
	11403-50-ACR	50 мм	1000
Черные фильтры с белой сеткой, тип 130, стерильные, для обнаружения грибов и дрожжей			
Размер пор 0,45 мкм	Номер	Диаметр	Упаковка, шт
	13006-47-ACN	47 мм	100
	13006-47-ACR	47 мм	1000
	13006-50-ACN	50 мм	100
	13006-50-ACR	50 мм	1000
Размер пор 0,65 мкм	Номер	Диаметр	Упаковка, шт
	13005-47-ACN	47 мм	100
	13005-50-ACN	50 мм	100
	13005-50-ACR	50 мм	1000
Размер пор 0,8 мкм	Номер	Диаметр	Упаковка, шт
	13004-47-ACN	47 мм	100
	13004-47-ACR	47 мм	1000
	13004-50-ACN	50 мм	100
Зеленые фильтры с темно-зеленой сеткой, тип 138, стерильные, для контрастирования слабоокрашенных и прозрачных колоний			
Размер пор 0,45 мкм	Номер	Диаметр	Упаковка, шт
	13806-47-ACN	47 мм	100
	13806-47-ACR	47 мм	1000
	13806-50-ACN	50 мм	100
	13806-50-ACR	50 мм	1000
Белые фильтры с темно-зеленой сеткой, тип 139, стерильные, для обнаружения микроорганизмов на окрашенных средах			
Размер пор 0,45 мкм	Номер	Диаметр	Упаковка, шт
	13906-47-ACN	47 мм	100
	13906-47-ACR	47 мм	1000
	13906-50-ACN	50 мм	100
	13906-50-ACR	50 мм	1000
Размер пор 0,65 мкм	Номер	Диаметр	Упаковка, шт
	13905-47-ACN	47 мм	100
Размер пор 1,2 мкм	Номер	Диаметр	Упаковка, шт
	13903-47-ACN	47 мм	100

Область применения питательных картонных подложек

Продукт	Микроорганизм	Тип ПКП
<i>Вода</i>	ОМЧ	Standard TTC, R2A, Malt extract
	<i>E. coli</i> и колиформы	Endo, Tergitol TTC, Teepol, M-FC, ECD
	Фекальные стрептококки	Azide
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cetrimide
<i>Безалкогольные напитки</i>	Кислотоустойчивые бактерии	Orange Serum
	ОМЧ	Standard, Standart TTC
	Молочнокислые бактерии	VLB-S7-S, Orange Serum
	Слизеобразующие бактерии	Weman
	Дрожжи и грибы	Wort, Schaufus-Pottinger, Malt extract
<i>Пиво</i>	Педиококки и лактобациллы	VLB-S7-S
	Дикие дрожжи	Lysine
	Дрожжи и грибы	Wort, Malt extract
<i>Вино</i>	Уксуснокислые бактерии	Wort, Orange serum
	Молочнокислые бактерии	Orange Serum
	<i>Leuconostoc oenos</i>	Tomato Juice
	Дрожжи и грибы	Wort, Schaufus-Pottinger, Malt extract
<i>Пищевые продукты</i>	ОМЧ	Standard TTC, Standard, Caso
	Энтеробактерии	Endo, Teepol, M-FC, Tergitol TTC, ECD, MacConkey, Chromocult
	Мезофильные и термофильные спорообразующие бактерии	Glucose-Tryptone
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cetrimide
	Сальмонеллы	Bismuth-Sulfite
	Стафилококки	Chapman
	Стрептококки	Azide
	Дрожжи и грибы	Wort, Malt extract
<i>Молоко</i>	<i>E. coli</i> и колиформы	Endo
	Сальмонеллы	Bismuth-Sulfite
	Стрептококки	Azide
<i>Сахар</i>	Мезофильные и термофильные спорообразующие бактерии	Glucose-Tryptone
	Дрожжи и грибы	Wort, Schaufus-Pottinger, Malt extract

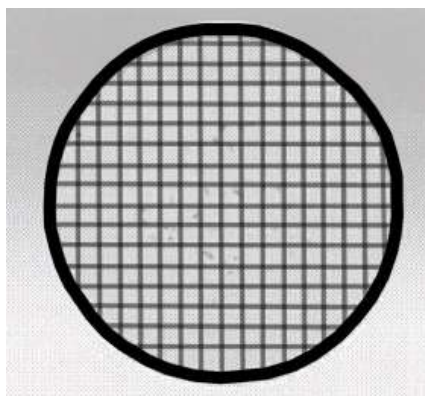


Рис. 27. Мембранный фильтр *Sartorius Tun 114* (белый фильтр с черной сеткой).

Все мембранные фильтры для микробиологии изготавливаются из нитрата целлюлозы, обеспечивающей хорошее удержание микроорганизмов, высокую скорость потока и оптимальный подсчет колоний. Сетка, нанесенная на поверхность мембранных фильтров, с размером ячеек 3,1×3,1 мм облегчает подсчет колоний, особенно при обильном росте и большом количестве микроколоний. Фильтры различных цветов обеспечивают контраст колоний на своей поверхности, что значительно облегчает подсчет.

Питательные картонные подложки.

Картонные подложки *Sartorius* в сочетании с методом мембранной фильтрации успешно используются уже в течение более 20 лет. Они обеспечивают простоту и легкость микробиологических исследований.

Питательная картонная подложка (ПКП) – это диск из сорбирующего материала, пропитанный селективной питательной средой, а затем высушенный в специальных условиях и стерильно упакованный в чашку Петри. Активация питательной среды проводится непосредственно перед ее использованием, путём смачивания подложки стерильной дистиллированной водой. В комплекте с подложками поставляются и стерильные мембранные фильтры. *Sartorius* производит 26 типов ПКП (Табл. 12).

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.

Доведение массы пробирок или фильтров до постоянного значения.

С этой целью фильтры, предварительно положенные в открытую чашку Петри или центрифужные пробирки (не пластиковые), помещают в сушильный шкаф и высушивают в течение 1 – 2 ч при температуре 80 – 85°C (фильтры) или 90 – 100°C (пробирки). Затем чашку Петри с фильтрами или центрифужные пробирки вынимают из сушильного шкафа и быстро переносят в эксикатор с безводным хлористым кальцием (CaCl_2) или концентрированной серной кислотой. Эксикатор ставят около аналитических весов, на которых будет проводиться взвешивание. Через час фильтры (пробирки) взвешивают с точностью до 0,0001 г. Высушивание и взвешивание повторяют, соблюдая указанную последовательность операций, пока масса не достигнет постоянного значения, т.е. колебания в ее определениях не будут превышать десятых долей мг.

Отделение микроорганизмов от среды.

Осуществляется центрифугированием или фильтрованием. В центрифужную пробирку наливают точно измеренный объем тщательно перемешанной жидкой культуры, который в зависимости от ее плотности колеблется от 5 до 20 см³. Время центрифугирования и число оборотов зависят от размеров клеток. Чем они меньше, тем больше требуется оборотов и тем продолжительнее должно быть время центрифугирования. Чаще всего центрифугируют 20 – 30 мин при 3 – 5 тыс. об/мин. После центрифугирования надосадочную жидкость осторожно сливают, осадок промывают слегка подкисленной дистиллированной водой (1 см³ концентрированной HCl на 1000 см³ воды) и снова центрифугируют при том же числе оборотов. Супернатант сливают сразу после остановки центрифуги. В противном случае часть осадка может быть потеряна.

Мицелий актиномицетов и грибов отделяют фильтрованием. Бумажный фильтр помещают в стеклянную воронку и фильтруют через него точно измеренный объем культуры – от 5 до 10 см³. Осадок на фильтре многократно промывают подкисленной дистиллированной водой.

Для отделения бактерий используют мембранные фильтры. Размеры пор мембранного фильтра должны быть меньше величины клеток, биомассу которых определяют. Мембранный фильтр помещают на пористую пластинку специального держателя, вставленного в колбу. Чтобы ускорить фильтрование, установку подключают к водоструйному насосу. Осадок несколько раз промывают подкисленной водой.

Определение биомассы.

Чтобы определить массу сухих клеток, центрифужную пробирку или фильтр с осадком клеток микроорганизмов помещают в сушильный шкаф, высушивают и взвешивают. Режим высушивания и взвешивания тот же, что использовали и при определении массы пробирок или фильтров. Сухую биомассу определяют по формуле:

$$M = \frac{(A - B) \cdot 1000}{V},$$

где

- M*** – сухая биомасса г/л;
- A*** – масса фильтра (пробирки) с осадком, г;
- B*** – масса фильтра (пробирки) без осадка, г;
- V*** – объем культуральной жидкости, взятый для фильтрации (центрифугирования), см³.

Точность метода определяется полнотой отмывания клеток от компонентов среды и тщательностью взвешивания.

Оптические методы количественного учета.

Определение количества клеток и биомассы нефелометрическим методом.

Питательная среда для культивирования микроорганизмов, в которой предполагается определять число клеток по светорассеянию, должна быть оптически прозрачной.

Изменение интенсивности света при прохождении через суспензию клеток измеряют с помощью нефелометра, фотоэлектроколориметра (ФЭК) или спектрофотометра, выбирая длину волны (обычно в интервале 540 – 650 нм), при которой поглощение света данной суспензией клеток минимальное. При высоких концентрациях клеток в культуральной среде происходит вторичное рассеяние света, что приводит к занижению результатов. Правила работы на указанных приборах подробно изложены в прилагаемых к ним инструкциях.

В некоторых случаях плотность клеточной суспензии выражают в показателях нефелометра. Однако чаще строят калибровочные кривые между величиной светорассеяния и числом клеток или сухой биомассой в единице объема. Для построения калибровочной кривой поступают следующим образом. Измеряют величину оптической плотности суспензии с различным содержанием клеток и в каждой из них определяют одним из применяемых методов количество клеток или биомассу. Полученную зависимость выражают графически, откладывая на оси ординат показания прибора, а на оси абсцисс – количество клеток, содержащихся в 1 см³ суспензии, или биомассу в г/л. Для каждого микроорганизма следует строить свою калибровочную кривую.

Стандарты мутности и их применение.

В ряде случаев количество клеток в суспензии бывает достаточно определить визуально путем сравнения со стандартом мутности. Стандарты мутности представляют собой взвесь частиц стекла пирекс в дистиллированной воде. За единицу стандарта мутности условно принята мутность суспензии (в физ. растворе) бактерий – возбудителей тифа с концентрацией клеток 100 млн./см³. Стандарт мутности включает 4 эталона на 11, 10, 9 и 5 единиц, что соответствует содержанию $1,1 \cdot 10^9$; $1,0 \cdot 10^9$;

$0,9 \cdot 10^9$ и $0,5 \cdot 10^9$ клеток в 1 см^3 взвеси. Для определения количества клеток пробирку с исследуемой суспензией ставят рядом с эталоном 10 и рассматривают их в отраженном и проходящем свете на фоне белого листа бумаги, в центре которого нанесено несколько черных линий. Эталоны 9 и 11 вспомогательные, позволяющие более четко сравнить мутность исследуемой суспензии бактерий с эталоном. Стандартизация мутности суспензии бактерий (особенно часто в случае тест-организмов) имеет существенное значение при приготовлении посевного материала в серийных опытах.

При работе с дрожжами данным методом, выбранный эталон требует предварительной калибровки, каким-либо из описанных методов. Необходимость такой процедуры вызвана значительно бо́льшим размером дрожжевых клеток и существенными межрасовыми различиями.

Физиологические признаки.

Совокупность характеристик, отражающих потребности дрожжевых организмов в определенных физико-химических условиях среды относят к физиологическим признакам. Из этих признаков для целей идентификации используют следующие: способность к сбраживанию сахаров до углекислого газа и этанола в анаэробных условиях (брожение), усвоение безазотистых источников углерода путем их окисления в аэробных условиях (ассимиляция), потребление различных источников азота, рост на среде без витаминов, максимальные для роста температуры, способность расти при повышенном осмотическом давлении среды и прочие. В технологическом смысле все перечисленные свойства имеют большее или меньшее значение.

Общими требованиями при проведении физиологических тестов являются использование при этом свежих (обычно 1 – 2-суточных) активно растущих культур дрожжей, высокоочищенных препаратов веществ, не содержащих примесей, которые могут обусловить ложные результаты, и культивирование организмов при оптимальных для их роста температурах.

Определение интенсивности брожения и дыхания.

Уровни интенсивности дыхания (Q_{O_2}) и интенсивности брожения (Q_{CO_2}) измеряют у молодых клеток, исследуемых на одной стадии развития, культивируемых на одной и той же синтетической среде, содержащей глюкозу и полной с точки зрения содержания минеральных и азотсодержащих веществ, а также витаминов. Измерения производят на приборе для определения энергии дыхания и брожения микроорганизмов Одинцовой (Рис. 28) или манометрическим способом на аппарате Варбурга (Рис. 29) для газообмена.

В аппарате Варбурга и в приборе Одинцовой газометрическая часть состоит из тонких стеклянных трубок с делениями, снабженных пришлифованными кранами, позволяющими регистрировать выделяющийся

углекислый газ (брожение) и поглощение кислорода (дыхание) дрожжами определенной массы в течение короткого времени.

Подготовка культуры.

Чашки Петри с богатой питательной средой (сусло-агар с 0,3 % дрожжевого автолизата) засевают экспериментальными расами. Через 5 – 7 суток культивирования в термостате посев смывают с чашек стерильной водой, отфильтровывают и промывают также водой на воронке Бюхнера, затем отпрессовывают между листиками фильтровальной бумаги, и берут по весу для приготовления суспензии.

Брожение проводят с 2 % отпрессованных дрожжей на 4 %-ном растворе глюкозы в буферной смеси по Мак-Ильвейну (лимонная кислота и двухосновный фосфорнокислый натрий в концентрации 1/20 моля). Сахарный раствор вносится в боковую ампулу.

Для определения дыхания используют 0,5 % отпрессованных дрожжей и однопроцентный раствор сахара (можно готовить из суспензии, приготовленной для определения брожения).

Длительность опытов – 2 часа при температуре 28°C.

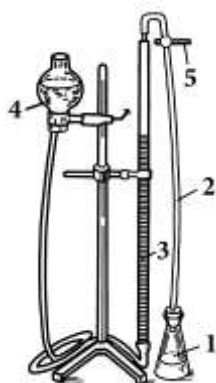


Рис. 28. Прибор Одинцовой.

- 1 – бродильный сосуд;
- 2 – соединительная трубка;
- 3 – бюретка;
- 4 – уравнильный сосуд;
- 5 – трехходовой кран.

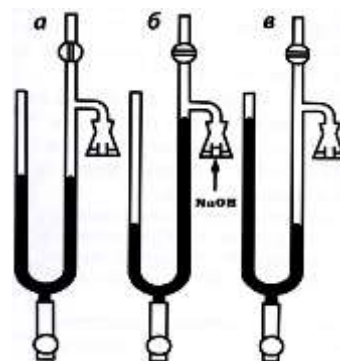


Рис. 29. Аппарат Варбурга.

- а – исходное положение манометра;
- б – измерение интенсивности дыхания;
- в – измерение интенсивности брожения.

Показатель количества углекислого газа в см^3 , выделенного за 1 час на 1 мг дрожжей (может быть в атмосфере CO_2 или другого инертного газа) обозначают Q_{CO_2} ; показатель количества кислорода в см^3 , поглощенного за 1 час на 1 мг дрожжей обозначают Q_{O_2} .

Дрожжи по этим показателям различаются:

- только окисляющие;
- обладающие равной интенсивностью и дыхания и брожения;

- имеют достаточно высокую окислительную способность и малоактивны по брожению;
- интенсивность брожения высокая при относительно низкой интенсивности дыхания;
- слабая интенсивность дыхания и не очень высокая брожения.

Для характеристики истинных бродильных свойств различных рас производственных дрожжей используют коэффициент – отношение интенсивности брожения к интенсивности дыхания (Q_{CO_2}/Q_{O_2}). Чем выше этот показатель, тем выше энергия брожения расы дрожжей в определенных условиях.

Работая на этих аппаратах, удобно вести исследования по влиянию условий культивирования дрожжей и воздействию факторов роста и активаторов брожения.

Процентное содержание дыхательного фермента клетки изменяется в зависимости от степени аэрации питательной среды. В противоположность этому интенсивность сбраживания является относительно постоянной в течение всего периода брожения и снижается только к его концу, когда число живых клеток уменьшается. Интенсивность сбраживания выражают в мм³ газа на 1 мг дрожжей в час.

Лафон разделил дрожжи по этому признаку на шесть групп:

1. Дрожжи только окисляющие. *Debaryomyces*, выделенные из вин, и *S. vini* не вызывают сбраживания сахаров или сбраживают их только в виде следов. Интенсивность дыхания равна примерно 25;
2. *P. fermentans* и *H. anomala* имеют интенсивность дыхания, часто равную и иногда превосходящую интенсивность сбраживания;
3. *M. pulcherrima* имеет достаточную окислительную способность и малоактивна с точки зрения сбраживания. Отношение дыхания к брожению равно 30 : 90;
4. Для *Sacch. bailii* дыхание составляет от 13 до 18 %. В эту же категорию входят виды *Hanseniaspora*. Интенсивность сбраживания составляет от 100 до 150 при интенсивности дыхания от 15 до 20;
5. У рода *Saccharomyces* отношение дыхания к брожению всегда ниже 10 % при интенсивности брожения от 200 до 300. Такие же данные и у *Torulopsis stellata* при несколько более слабой интенсивности брожения;
6. *Brettanomyces* – дрожжи с замедленным метаболизмом, имеют слабую интенсивность дыхания при интенсивности сбраживания около 50.

Сбраживание сахаров.

Для описания и идентификации микроорганизмов широко используют некоторые особенности их обмена веществ, выявляемые по способности изучаемого организма расти на принятых в настоящее время диагностических средах и вызывать те или иные превращения веществ,

входящих в состав этих сред. Эмпирически давно отмечено, что немало характеристик дрожжей, в том числе и физиологических, взаимосвязаны. Подобные корреляции полезно помнить, т.к. они могут служить дополнительным контролем и предостеречь от грубых ошибок. Применительно к сбраживанию сахаров наиболее общими являются два правила:

- 1) если дрожжи сбраживают какой-либо сахар, то они могут сбраживать и глюкозу;
- 2) если дрожжи сбраживают какой-либо сахар, то они могут также его ассимилировать. Обратное – неверно.

Наиболее простыми и общедоступными методами установления способности дрожжей к сбраживанию сахаров являются:

- 1) с использованием трубок Дунбара;
- 2) с использованием трубок Дурхэма (поплавков) (Рис. 30);
- 3) посев в столбик полужидкого агара.

Для получения концентрации 2 % (раффинозы 4 – 6 %) отдельные сахара растворяют в разведенном в соотношении 1 : 10 дрожжевом автолизате или в 0,5 %-ном растворе дрожжевого экстракта. Использование в качестве растворителя дрожжевой воды не рекомендуется, поскольку она часто содержит значительные количества трегалозы, которая может сбраживаться дрожжами.

Чтобы обнаружить изменение рН, к среде добавляют индикатор – бромкрезоловый пурпурный – из расчета 2 см³ 1,6 %-ого спиртового раствора на 1 л среды. При рН 6,8 индикатор имеет пурпурный, а при рН 5,2 желтый цвет. Можно использовать в такой же концентрации бромтимоловый голубой, который при рН 6,0 желтого, а при рН 7,6 синего цвета.

С использованием трубок Дунбара.

Растворы сахаров разливают по трубкам Дунбара и автоклавируют 15 мин при 112°C. При этом в слепом колене трубки нередко образуются пузырьки воздуха. Перед засевом, осторожно наклоня трубку, их необходимо удалить. Посев производят культурами с сусло-агара или 0,1 – 0,2 см³ суспензии клеток исследуемых дрожжей. Инкубация длится от 24 часов до 10 суток. О способности к сбраживанию сахара свидетельствует образование газа в закрытом колене трубки.

С использованием поплавков.

Приготовленные растворы сахаров разливают по пробиркам на 1/2 объема, в которые для определения газообразования опускают поплавки запаянным концом вверх (трубочки, диаметром 5 – 7 мм, длиной – 35 – 45 мм, запаянные с одного конца). Горлышко пробирки закрывают большим пальцем и осторожно переворачивая, заполняют поплавок жидкой средой. Пробирки закрывают ватно-марлевыми пробками и автоклавируют 20 минут при 0,1 МПа. После автоклавирования среда из поплавков вытиснется, но по мере охлаждения поплавки снова заполнятся.

Посев производят культурами с сусло-агара или 0,5 – 1,0 см³ суспензии клеток исследуемых дрожжей.

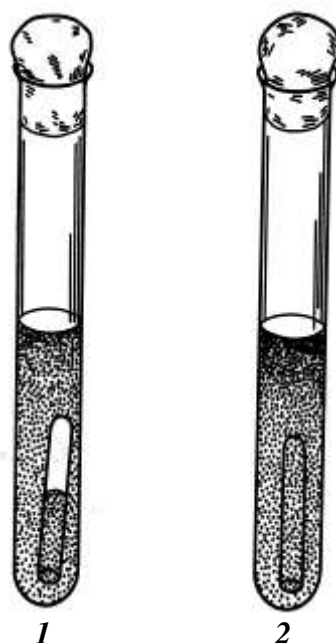


Рис. 30. *Накопление газа в поплавке.*

1 – рост культуры сопровождается образованием газа;

2 – газ не образуется.

При необходимости соблюдения анаэробных условий инкубирования, после посева поверхность среды заливают стерильным парафином, стерильным вазелиновым маслом или их стерильной смесью 1 : 1.

Инкубация длится от 24 часов до 10 суток.

О способности к сбраживанию данного углевода свидетельствует газообразование и вытеснение питательной среды из поплавка.

Посев в столбик полужидкого агара.

В приготовленные растворы сахаров вносят 0,5 % агара, 0,3 % дрожжевого автолизата, кипятят до полного растворения, разливают в пробирки на 1/2 объема, автоклавируют 20 мин при 0,1 МПа. Из автоклава пробирки переносят в штатив и выдерживают вертикально до полного охлаждения.

Посев производят бактериологической иглой уколom до дна пробирки культурами с сусло-агара или суспензии клеток исследуемых дрожжей.

При необходимости соблюдения анаэробных условий инкубирования, после посева поверхность среды заливают стерильным парафином, стерильным вазелиновым маслом или их стерильной смесью 1 : 1.

Инкубация длится от 24 часов до 10 суток.

О способности к сбраживанию данного углевода свидетельствует газообразование и разрывы столбика полужидкого агара.

Для учета полученных результатов можно использовать таблицу **13**.

**Показатели роста исследуемых культур дрожжей
на средах с углеводами и спиртами**

Углевод, спирт	Помутнение среды, пленка, осадок	Образование газа	pH среды		
			подкисление	подщелачивание	без изменения
<i>Глюкоза</i>					
<i>Сахароза</i>					
<i>Мальтоза</i>					
<i>Галактоза</i>					
<i>Арабиноза</i>					
<i>и т.д.</i>					

Микроорганизмы характеризуются неодинаковой способностью использовать различные углеводы и спирты в качестве единственных источников углерода и энергии. Перечень сахаров, способность к сбраживанию которых определяют при идентификации дрожжей, включает:

Гексозы

D-Глюкоза*
D-Галактоза*
L-Сорбоза
L-Рамноза

Пентозы

D-Ксилоза
L-Арабиноза
D-Арабиноза
D-Рибоза

Дисахариды

Сахароза*
Мальтоза*
Трегалоза*
Мелибиоза*
Лактоза*
Целлобиоза*

Гликозиды

α -Метил-D-глюкозид*
Арбутин
Салицин

Трисахариды

Раффиноза*
Мелицитоза*

Полисахариды

Инулин*
Растворимый крахмал*

Спирты

Этанол
Глицерин
i-Эритрит
Адонит
Дульцит
D-Маннит
D-Сорбит
i-Инозит

Органические кислоты

DL-Молочная кислота
Янтарная кислота
Лимонная кислота

**используются в тестах, как на ассимиляцию, так и на брожение.*

Из этих углеводов специального рассмотрения требует раффиноза, поскольку этот трисахарид может по-разному сбраживаться дрожжами: полностью, на 2/3 или же на 1/3 молекулы, что учитывается при идентификации (Таб. 14). О том, насколько полно и каким образом сбраживается раффиноза исследуемыми дрожжами можно судить по способности к сбраживанию сахаров, входящих в состав молекулы раффинозы (Рис. 31), или определением остаточных сахаров в среде.

Таблица 14

Возможные варианты сбраживания раффинозы дрожжами

Сбраживание			Степень сбраживания молекулы раффинозы
<i>мелибиозы</i>	<i>сахарозы</i>	<i>галактозы</i>	
+	+	+	Полное
+	+	—	На 2/3 (остается галактоза)
—	+	+ или —	На 1/3 (остается мелибиоза)
+	—	+	На 1/3 (остается сахароза)

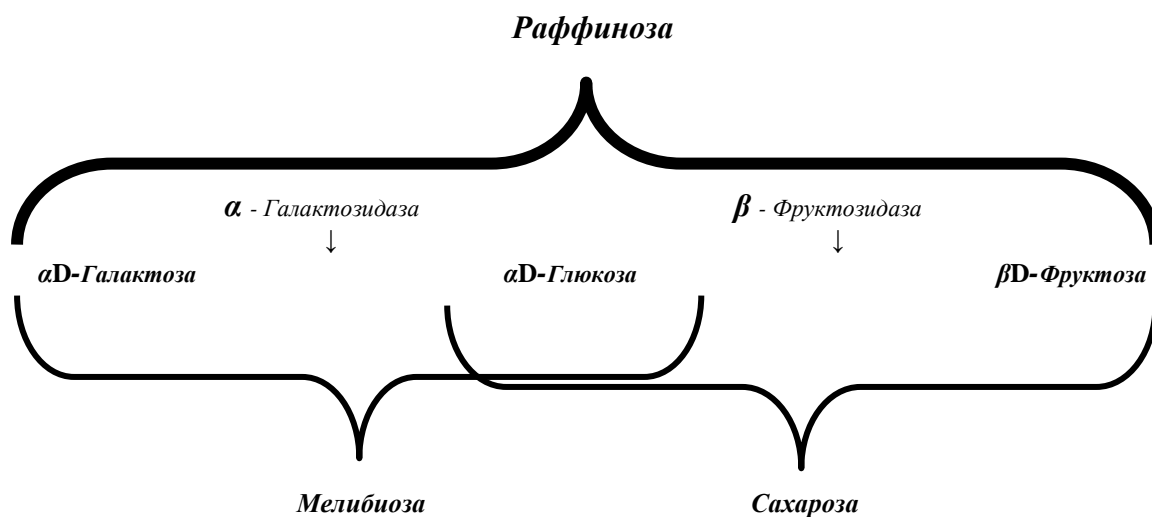


Рис. 31. Структура молекулы раффинозы.

Избирательное сбраживание глюкозы и фруктозы.

Известно, что в присутствии смеси глюкозы и фруктозы, такой, как инвертный сахар, дрожжи сбраживают прежде всего глюкозу и после этого поглощают фруктозу. Но некоторые дрожжи ведут себя по-другому. При расчете процентного содержания сброженной глюкозы, когда 50 % фруктозы уже сброжено, различают три категории дрожжей:

1. Дрожжи, сбраживающие к этому моменту от 80 до 85 % глюкозы. Это наиболее многочисленные, глюкозофильные дрожжи. К этой категории относится большая часть видов *Saccharomyces*, а также *Saccharomycodes* и *Brettanomyces*;
2. Дрожжи, которые предпочтительно поглощают фруктозу или фруктозофильные; они используют в этих условиях только от 5 до 10 % глюкозы. Их представляют три вида: *Sacch. bailii*, *Sacch. rouxii* и *T. stellata*;
3. Дрожжи, разлагающие оба сахара с почти одинаковой скоростью, во всяком случае, с начала брожения. К моменту, когда они поглощают половину фруктозы, исчезает от 40 до 60 % глюкозы. В эту категорию входят восемь видов дрожжей, в том числе виды *Hanseniaspora*.

Зимазная, инвертазная и мальтазная активность.

Зимазная, инвертазная и мальтазная активность — основные, с технологической точки зрения, показатели ферментативной активности дрожжей.

Например, для оценки качества хлебопекарных дрожжей приняты следующие показатели ферментативной активности:

Таблица 15

Технологические показатели ферментативной активности дрожжей

Качество дрожжей	Активность (мин)	
	зимазная	мальтазная
Хорошее	40 – 60	85 – 110
Удовлетворительное	60 – 80	110 – 160
Неудовлетворительное	80 и более	160 и более

Газометрический способ.

По скорости сбраживания дрожжами глюкозы, сахарозы и мальтозы определяют соответственно зимазную, инвертазную и мальтазную активность, выражаемую во времени, необходимом для выделения $10 \text{ см}^3 \text{ CO}_2$ из 5 %-ого раствора сахара. Для определения пользуются микрогазометром системы Елецкого (Рис. 32), изготовляемым на месте.

Прибор состоит из стаканчика 1 и манометрической крышки, соединяемых при помощи шлифованной поверхности. Диаметр стаканчика (внутренний) равен 50 мм, высота – 60 мм. Манометрическая крышка состоит из чашки 2 диаметром (внешний) 50 мм, высотой 25 мм и измерительной трубки 3 высотой 250 мм и внутренним диаметром 8 – 10 мм. В манометрической крышке имеется изогнутая газоотводная трубка 4 внутренним диаметром 3 мм с трехходовым краном 5, при помощи которого газоотводная труба соединяется как с внутренней камерой газомера – стаканчиком, так и с внешней средой.

Перед началом работы в манометрическую крышку заливают насыщенный раствор поваренной соли, подкрашенный метиленовым синим. Раствор наливают до основания измерительной трубки, и этот уровень принимают за ноль, все шлифы смазывают вазелином.

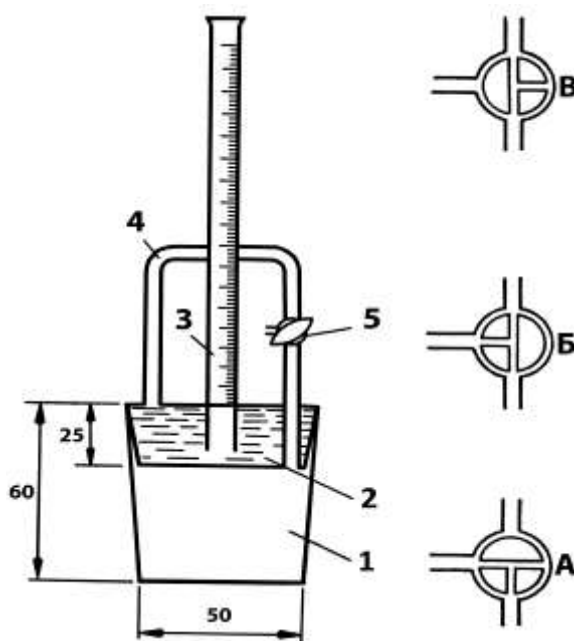


Рис. 32. Микрогазометр Елецкого.

1 – стаканчик; 2 – чашка; 3 – измерительная трубка;
4 – газоотводная трубка; 5 – трехходовой краник.

Измерительную трубку градуируют с точностью до 1 см^3 . Высоту h 1 см^3 на измерительной трубке вычисляют по следующей формуле:

$$h = \frac{1000 \cdot 4}{\pi \cdot r^2},$$

где

r – радиус измерительной трубки, см³; ($r = 4$ мм)

Подставив это значение в формулу, получим:

$$h = \frac{1000 \cdot 4}{3,14 \cdot 64},$$

0,5 г прессованных товарных дрожжей, или отпрессованных на воронке, или снятых с поверхности плотной агаризованной среды, помещают в стаканчик прибора, заливают 10 см³ водопроводной воды температурой 35°C и размешивают. К полученной суспензии добавляют 10 см³ 10 %-ого раствора сахара (глюкозы, сахарозы или мальтозы) и быстро закрывают стаканчик манометрической крышкой, предварительно переведя трехходовой кран 5 в положение *А*. Затем кран переводят в положение *Б* для выравнивания давления внутри прибора с атмосферным давлением. После этого кран переводят в положение *В* и прибор помещают в термостат при температуре 35°C, засекают время и наблюдают за прибором, пока не выделится 10 см³ диоксида углерода и жидкость в измерительной трубке не поднимется на соответствующую высоту. Время, затраченное на выделение 10 см³ газа, выраженное в минутах, называют зимазной, инвертазной или мальтазной активностью при использовании соответственно глюкозы, сахарозы или мальтозы.

После окончания анализа кран на газоотводной трубке переводят в положение *Б*, чтобы жидкость в трубке опустилась, и разъединяют манометрическую трубку и стаканчик. Из стаканчика выливают жидкость, ополаскивают его водой и вытирают досуха.

Манометрический способ.***

Для определения ферментативной активности предлагается прибор (Рис. 22), состоящей из колбы (100 – 120 см³), газоотводной трубки с краном и чувствительного манометра (медицинский для измерения артериального давления).

Перед началом работы измерить объем используемой колбы до нижнего края тщательно притертой резиновой пробки и объем проходящей через пробку газоотводной трубки. Для этого заполнить колбу и трубку водой, а затем измерить объем вместившейся жидкости мерным цилиндром. Полученную величину нанести на колбу и в дальнейшем использовали как "постоянную".

В колбу поместить 0,5 г прессованных дрожжей, залить 10 см³ водопроводной воды температурой 35°C и размешать до однородной суспензии. Затем добавить 10 см³ 5 %-ого раствора сахара (глюкозы, сахарозы или мальтозы) и закрыть колбу резиновой пробкой с газоотводной трубкой, соединенной с манометром. Для уравнивания давления в колбе с атмосферным давлением извлечь подвижную часть краника и сразу поместить его на место тщательно притерев и совместив отверстия. Подготовительный таким образом прибор поместить в термостат при 35°C (308 K) и регистрировать время за которое стрелка манометра достигнет необходимой отметки, соответствующей 10 см³ выделенного углекислого газа.

Величину давления в определенном ранее объеме используемой колбы определить по уравнению Менделеева – Клапейрона:

$$pV = nRT \quad \text{или} \quad pV = \frac{m}{M} RT \quad \text{или} \quad m = \frac{pVM}{RT}, \quad (1)$$

где

$$m - \text{масса газа}; \quad M = 44 \text{ г}; \quad p = 700 \text{ мм.рт. ст.}; \\ R = 62360 \text{ мм.рт.ст./моль K}; \quad V = 10 \text{ см}^3; \quad T = 308 \text{ K}.$$

Тогда:

$$m = \frac{700 \cdot 10 \cdot 44}{62360 \cdot 308} = 0,016 \text{ г}$$

Таким образом, установлено, что в состоянии реального газа масса 10 см³ диоксида углерода равна 0,016 г

Для приведения давления газа в условия эксперимента формулу (1) преобразовали:

$$p_x = \frac{mRT}{V_x M} \quad (2)$$

где

$$p_x - \text{показание манометра}; \quad T = 308 \text{ K}; \quad m = 0,016 \text{ г}; \quad V_x = 104 \text{ см}^3; \\ R = 62360 \text{ мм.рт.ст./моль K}; \quad M = 44 \text{ г}.$$

Значение V_x определяется вычитанием объема дрожжевой суспензии (20,5 см³) из общего объема в системе (124,5 см³). Тогда:

$$p_x = \frac{0,016 \cdot 62360 \cdot 308}{104 \cdot 44} = 67,15 \text{ мм.рт.ст.},$$

где

p_x — это давление создаваемое газом массой 0,016 г и объемом 10 см³ в используемом объеме V_x при температуре T .

При условии, что в дальнейшей работе значения R , M и m будут использоваться как "постоянные" получится формула:

$$p_x = \frac{22,67 \cdot T}{V_x} \quad (3)$$

На основании произведенных расчетов установлено, что используя прибор с постоянным свободным объемом (в приведенном примере – 104 см³) остается лишь регистрировать время за которое стрелка манометра достигнет необходимой отметки (в приведенном примере – 67 мм. рт. ст.)

Если за единицу измерения будет принят 1 Па, данная формула будет представлена как:

$$p_x = \frac{3,023 \cdot T}{V_x} \quad (4)$$

Продукты брожения.

При брожении, наряду с этиловым спиртом и углекислым газом, образуется ряд побочных и вторичных продуктов. Эквивалентность между глицерином (Г) и суммой других вторичных продуктов: уксусной кислоты (У), янтарной кислоты (Я), 2,3-бутандиола (Б), ацетоина (А), остаточного свободного ацетальдегида (Э) – с коэффициентом при каждом из них, выведенным из химического уравнения, установлена аналитически.

Предложено уравнение, вытекающее из баланса спиртового брожения Нейберга:

$$5Я + 2У + Б + 2А + Э = \Sigma \leq Г$$

Это уравнение эквивалентности (Σ от 0,8 до 1,0) подтверждается для всех дрожжей, имеющих только бродильный тип обмена веществ. Для других групп дрожжей это отношение действительно только в условиях абсолютного анаэробноза и не подходит для среды с доступом воздуха.

Для характеристики рас дрожжей, особенно промышленного назначения, необходимы сведения об образовании ими продуктов брожения, имеющих весьма важное значение в формировании конечного продукта.

Потребность в витаминах.

Способность дрожжей синтезировать все необходимые для роста витамины или потребность в наличии каких-либо из них в среде используют при идентификации видов в качестве дополнительных характеристик. Нельзя недооценивать и технологическое значение этого фактора.

В некоторых случаях потребность в определенных витаминах присуща всем представителям рода. Например, все виды *Hanseniaspora*, *Kloeckera* нуждаются в инозите и пантотеновой кислоте. В других родах зависимость по каким-либо витаминам или способность расти на безвитаминной среде характерны для отдельных видов или даже разновидностей. Наиболее часто дрожжи нуждаются в обеспечении биотином и тиамином.

Постановка теста на способность к росту в среде без витаминов (Табл. 6), и определение их значения как факторов роста, осуществляется аналогично постановке тестов на способность к ассимиляции источников углерода. Поскольку дрожжи способны накапливать в клетках значительные количества витаминов, для приготовления инокулята в данном тесте используют культуры дрожжей, предварительно выращенные в безвитаминной среде.

Интенсивность брожения или накопления биомассы на жидких и плотных средах свидетельствует о значении данного витамина, как фактора роста для исследуемой культуры дрожжей. Медленный и слабый рост на безвитаминной основе рассматривают, как неспособность исследуемых организмов синтезировать все необходимые для роста витамины.

Для всех видов дрожжей, использующихся в промышленности, характерна специфическая потребность в том или ином факторе роста: мезоинозит, биотин, пиридоксин, тиамин, пантотеновая кислота, никотинамид, парааминобензойная кислота.

Для исследований используется безвитаминная среда.

Для каждой культуры готовят восемь пробирок; одна пробирка без факторов роста, другая – получает все, за исключением одного, каждый раз разного. Пробирки засевают минимальным количеством клеток (1 – 2 клетки на 1 мм³, микрозасев).

Для анализа опытов используют нефелометрирование, или подсчет клеток в счетных камерах, а также взвешивание хорошо укупоренных пробирок.

В результате получают данные как по скорости роста и накопления биомассы, так и по скорости и пределу сбраживания сахара.

В результате построения витаминограмм можно отобрать тест-культуры для определения того или иного фактора роста – витамина.

Рост на средах с повышенным осмотическим давлением.

Под осмотической устойчивостью понимают приобретенную способность некоторых рас и культур дрожжей сохранять ферментативную активность в

средах с относительно высоким осмотическим давлением. Это свойство следует отличать от осмофильности, которая является генетически закрепленным признаком отдельных родов и видов дрожжей, обитающих в специфических экологических условиях.*** При этом следует понимать, что дрожжи, устойчивые к высоким осмотическим давлениям, создаваемым в среде глюкозой, не всегда также устойчивы к давлениям, создаваемым солями.

Определить способность культуры сохранять свою жизнедеятельность в средах с высоким осмотическим давлением важно не только для выделения и идентификации осмофильных дрожжей. Данный показатель имеет значение при выборе рас, используемых в производстве хлебопекарных дрожжей, как фактор, влияющий на стойкость готовой продукции и ее технологические особенности. Кроме того, в последние годы и в селекции пивных и спиртовых рас все большее внимание уделяют осмотической устойчивости, исходя из технологических и экономических предпосылок.

Отношение к концентрации хлористого натрия.

Устойчивость разных видов дрожжей к этому фактору заметно варьирует. Большую или меньшую чувствительность дрожжей к концентрации соли оценивают по их способности расти в среде, обеспечивающей хороший рост с 2,5 и 6,5% NaCl. Исследуют устойчивость чистой культуры дрожжей из лабораторной коллекции или выделенной из производственного либо природного субстрата.

Для этих целей можно использовать жидкие, полужидкие и плотные среды.

На жидких средах.

Вариант 1.

Глюкоза	2,0 г
Дрожжевой автолизат	0,5 см ³
NaCl	0 10,0 г
Вода	до 100,0 см ³

Вариант 2.

Глюкоза	2,0 г
Дрожжевой экстракт	0,5 г
Пептон	1,0 г
NaCl	0 10,0 г
Вода	до 100,0 см ³

Среду разливают в пробирки и стерилизуют при 0,1 МПа. Через 6 – 10 суток после посева по помутнению среды или образованию осадка регистрируют рост микроорганизмов и его интенсивность или отсутствие

роста и делают заключение о чувствительности изучаемого микроорганизма к концентрации хлористого натрия.

Концентрация соли, при которой еще регистрируется рост исследуемой культуры дрожжей, принимается за показатель ее галотолерантности.

На жидких средах с использованием поплавков.***

Приготовленные солесодержащие среды разливают по пробиркам на 1/2 – 2/3 объема, в которые для определения газообразования опускают поплавки. Горлышко пробирки закрывают большим пальцем и осторожно переворачивая, заполняют поплавок жидкой средой. Пробирки закрывают ватно-марлевыми пробками и автоклавируют 20 минут при 0,1 МПа. После автоклавирования среда из поплавков вытиснется, но по мере охлаждения поплавки вновь заполнятся.

Посев производят культурами с сусло-агара или 0,5 – 1,0 см³ суспензии клеток исследуемых дрожжей.

При необходимости соблюдения анаэробных условий инкубирования, после посева поверхность среды заливают стерильным парафином, стерильным вазелиновым маслом или их стерильной смесью 1 : 1.

Инкубация длится от 24 часов до 10 суток.

О способности исследуемой культуры дрожжей расти при данной концентрации соли, свидетельствует газообразование и вытеснение питательной среды из поплавка.

Концентрация соли, при которой еще регистрируется рост исследуемой культуры дрожжей, принимается за показатель ее галотолерантности.

На полужидких средах.***

В жидкие фоновые среды (*Var. 1 и 2*, см. выше) вносят 0,5 % агара, кипятят до полного его растворения, разливают в пробирки на 1/2 объема, автоклавируют 20 мин при 0,1 МПа. Из автоклава пробирки переносят в штатив и выдерживают вертикально до полного охлаждения.

Посев производят бактериологической иглой уколom до дна пробирки культурами с сусло-агара или суспензии клеток исследуемых дрожжей.

При необходимости соблюдения анаэробных условий инкубирования, после посева поверхность среды заливают стерильным парафином, стерильным вазелиновым маслом или их стерильной смесью 1 : 1.

Инкубация длится от 24 часов до 10 суток.

О способности исследуемой культуры дрожжей расти при данной концентрации соли, свидетельствует газообразование и разрывы столбика полужидкого агара.

Концентрация соли, при которой еще регистрируется рост исследуемой культуры дрожжей, принимается за показатель ее галотолерантности.

На плотных средах.

В жидкие фоновые среды (*Вар. 1 и 2*, см. выше) вносят 2,5 % агара, кипятят до полного его растворения, переливают в коническую колбу на 1/2 объема, закрывают ватно-марлевой пробкой и автоклавируют 20 мин при 0,1 МПа. Сразу после автоклавирования разливают в заранее приготовленные стерильные высушенные чашки Петри. Когда агар полностью застынет чашки необходимо подсушить.

Посев производят бактериологической петлей или шпателем Дригальского культурами с сусло-агара или суспензии клеток исследуемых дрожжей.

Объем инокулята должен предполагать обязательное получение изолированных колоний после инкубации, что позволит не только выявить наличие или отсутствие роста при определенной концентрации соли, но и определить возможное влияние на культуральные свойства, т.е. на состояние клеточной массы.***

Инкубация длится от 24 часов до 10 суток.

При учете результатов регистрируют наличие или отсутствие роста дрожжей, его интенсивность и возможные отклонения в структуре колоний от таковых на контрольной среде.

Концентрация соли, при которой еще регистрируется рост исследуемой культуры дрожжей, принимается за показатель ее галотолерантности.

По разнице в подъемной силе.

На технических весах берут две навески испытуемых дрожжей по 0,31 г каждая. К первой навеске добавляют 4,8 см³ водопроводной воды, нагретой до 35°C, тщательно размешивают с помощью шпателя или пестика в фарфоровой чашке или в ступке, добавляют муку 85 %-ого 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°C, засекают время и поддерживают эту температуру до всплывания шарика.

Ко второй навеске добавляют 4,8 см³ 3,35 %-ого раствора поваренной соли, нагревают до 35°C и далее поступают так же, как с первой навеской.

Время, затраченное на всплывание шариков (мин), умножают на коэффициент 3,5 и получают величину подъемной силы, определяемую стандартным способом.

Шарик, замешенный 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.

Для прессованных хлебопекарных дрожжей в зависимости от их осмотической устойчивости, приняты показатели качества, указанные в таблице 16.

Таблица 16

***Технологические параметры осмотической устойчивости
хлебопекарных дрожжей***

<i>Величина осмотической чувствительности (мин)</i>	<i>Оценка качества</i>
<i>От 1 до 10</i>	Хорошие
<i>От 10 до 20</i>	Удовлетворительные
<i>Более 20</i>	Неудовлетворительные

Отношение к концентрации глюкозы.

Стандартный метод.

Готовят среду следующего состава:

Глюкоза	50 (60) г
Дрожжевая вода (или 1%-ный раствор дрожжевого автолизата)	50 (40) см ³
Агар	2,5 г

Среду кипятят до полного растворения агара и автоклавируют 15 мин при 112°C и разливают по чашкам.

Посев на чашки производят бактериологической петлей или шпателем Дригальского культурами с сусло-агара или суспензии клеток исследуемых дрожжей.

Объем инокулята должен предполагать обязательное получение изолированных колоний после инкубации, что позволит не только выявить наличие или отсутствие роста при определенной концентрации глюкозы, но и определить возможное влияние на характер колоний, т.е. на состояние клеточной массы.***

Инкубация длится от 24 часов до 10 суток.

Концентрация глюкозы, при которой еще регистрируется рост исследуемой культуры дрожжей, принимается за показатель ее осмотической устойчивости.

Основным недостатком метода можно считать обильное вытеснение сиропа на поверхность застывшего агара при высоких концентрациях сахара. Это исключает возможность получения изолированных колоний и их характеристики.***

*В полужидком глюкозно-дрожжевом агаре.****

Питательная среда включает:

Глюкоза	40 – 70 г;
Дрожжевой автолизат	0,5 см ³ ;
Агар	0,5 г;
Вода	до 100,0 см ³ .

Среду кипятят на медленном огне до полного растворения агара, разливают в пробирки высоким столбиком и стерилизуют при 0,1 МПа в течение 20 мин.

Полученный таким образом полужидкий агар застывает однородной массой, и независимо от концентрации глюкозы на поверхности среды нет капель вытесненного сиропа.

Посев исследуемой культуры производят бактериологической иглой глубоким уколом до дна пробирки.

При необходимости соблюдения анаэробных условий инкубирования, после посева поверхность среды заливают стерильным парафином, стерильным вазелиновым маслом или их стерильной смесью 1 : 1.

Инокулированные среды инкубируют при 30°C в течение 7 дней.

Наличие роста регистрируют по образованию пузырьков газа и разрывам питательной среды по всей длине укола.

При учете результатов отмечают наибольшую концентрацию глюкозы, при которой еще регистрируется рост, и принимают ее за показатель осмотической устойчивости исследуемой культуры дрожжей.

Отношение к температуре.

Определение оптимальной температуры для роста.

В последние годы способность дрожжей к росту при определенных температурах все чаще вводят в ключи в качестве дифференцирующего признака. Подавляющее большинство дрожжей, имеющих технологическое значение, относится к мезофилам. Однако оптимальная температура для роста микроорганизмов этой группы имеет достаточно широкий диапазон. Поэтому необходимо определить температуру, обеспечивающую физиологически сбалансированный рост изучаемой культуры. Для этого штрихом бактериологической петлей или сплошным посевом шпателем Дригальского засевают в 2-х повторениях плотные питательные среды в чашках Петри или скошенные в пробирках. Посевы помещают в термостат с температурой 15, 20 25, 30, 35, 40, 43, 45 и 48°C. Для низовых пивных

дрожжей температурный интервал следует устанавливать в пределах технологических требований.

В зависимости от скорости роста через 3 – 5 – 7 суток отмечают интенсивность роста исследуемого организма визуально по 4-балльной шкале: "0" – отсутствие роста, "+" – слабый рост, "++" – хороший рост, "+++" – очень хороший рост.

После первого пассажа проводят второй пассаж, с той лишь разницей, что для каждой температуры посевным материалом служат клетки соответствующего предыдущего пассажа. Чашки вновь помещают в термостаты с различной температурой и через 3 – 5 – 7 суток отмечают рост и его интенсивность. Количество пассажей определяется исследователем, но, как правило, проводят три пассажа. Температура, при которой исследуемая культура дает одинаково интенсивный рост (без изменения культуральных признаков***) в, как минимум, трех пассажах считается оптимальной.

Для записи результатов наблюдений можно использовать таблицу 17.

На основании полученных результатов делают вывод об оптимальной температуре для роста изучаемой культуры.

При определении температуры, оптимальной для роста представителей психрофилов или термофилов, используют другие диапазоны температур: соответственно от – 5 до 20° и от 50 до 80°.

Таблица 17

***Интенсивность роста исследуемых дрожжей
в зависимости от температуры***

<i>Пассаж</i>	<i>Температура, °C</i>						
	25	30	35	40	43	45	48
<i>Первый</i>							
<i>Второй</i>							
<i>Третий</i>							
<i>и т.д.</i>							

Холодо- и термоустойчивость дрожжей.

Брожение сусла при температурах ниже 10°C и выше 30°C часто заканчивается недобродом, т. е. неполным сбраживанием сахаров сусла. Для сбраживания сусла при низких и высоких температурах целесообразно применять холодо- и термоустойчивые расы дрожжей.

Для отбора холодоустойчивых культур изучают бродильную способность (скорость и полноту сбраживания 18 – 20 % сахаров в сусле) при температуре 7 – 10°C и отбирают те расы, которые начинают размножаться и сбраживают

сусло быстрее и полнее других. При температуре 30 – 35°C этими дрожжами сбраживается лишь около 50 % сахаров.

Для отбора термоустойчивых культур изучают бродильную способность при температуре 30 – 35°C и отбирают те расы дрожжей, которые начинают размножаться и сбраживать сусло быстрее и полнее других при этой температуре.

Методика постановки опытов и контроль за ходом брожения описаны в разделе «Бродильная активность».

Для получения более объективной информации следует использовать микроскопические методы оценки качественных и количественных параметров состояния исследуемых культур дрожжей.***

Кроме того, важным показателем физиологического состояния исследуемой культуры и возможности ее технологического использования могут служить, образующиеся в данных температурных условиях продукты брожения и степень отличия их количества от таковых при оптимальном температурном режиме. Для этого можно использовать формулу:

$$5Я + 2У + Б + 2А + Э = \Sigma \leq Г,$$

описанную в разделе «Продукты брожения». ***

Целесообразно при отборе новых холодо- и термовыносливых рас дрожжей в качестве контроля брать музейные расы, обладающие этими свойствами.

Спиртообразующая способность – кривые брожения.

Спиртообразующую способность оценивают по максимальному количеству спирта, которое могут образовать расы при сбраживании высокосахаристого сусла.

Результат учитывается по максимальной спиртуозности бражки, полученной при использовании исследуемых дрожжей в сусле с достаточным содержанием сахара. Опыты проводятся в небольших склянках для брожения вместимостью 90 см³, содержащих 60 см³ сусла. В одной серии склянок ведут анаэробное брожение под стеклянной трубкой с оттянутым тонким концом, в другой – они закрыты простыми ватными пробками. Склянки оставляют на брожение в термостате при 25°C. Повторные взвешивания позволяют начертить кривые потерь массы.

По окончании брожения определяют содержание спирта пикнометрическим методом, флотационным методом или окислением спирта бихроматом.

Спиртоустойчивость.

Известно, что этиловый спирт действует токсично на все дрожжевые расы, но его ингибирующая концентрация варьирует в широком диапазоне.

Присутствие в сусле незначительных количеств спирта оказывает слабое стимулирующее действие на размножение клеток. Но с увеличением концентрации спирта до 1,5 – 2,0 % размножение клеток тормозится, а при 5,0 % прекращается полностью. Токсические свойства этого соединения есть результат нарушения пористости и проницаемости клеточной мембраны, что, естественно, приводит к проблемам транспорта питательных веществ и дефициту доступной цитоплазмы воды.

Сложность механизмов устойчивости дрожжевых клеток к этиловому спирту подтверждается и тем фактом, что выявлено более 250 генов, участвующих в этом процессе.

Стандартный метод.

В большинстве случаев расы, обладающие высокой спиртообразующей способностью, являются и спиртоустойчивыми. Под спиртоустойчивостью следует понимать способность рас проявлять жизнедеятельность при высоких концентрациях спирта в среде.

Для определения спиртоустойчивости рас дрожжей готовят разводки исследуемых рас на стерильной среде, содержащей 10 – 11 % спирта и 2 % глюкозы при температуре 25°C. Через 5 суток разводку каждой расы дрожжей вносят в количестве 1 % в пропастеризованную или автоклавированную среду, содержащую 15 % спирта и 2 % глюкозы. Посев выдерживают при температуре 25°C и отмечают, на какие сутки в среде размножились дрожжи и они начали бродить. О положительном результате свидетельствуют помутнение среды и газообразование.

Наиболее спиртоустойчивыми являются расы дрожжей, ранее других размножившиеся и забродившие в среде с 15 % спирта, наименее спиртоустойчивые расы в такой среде не размножаются и не бродят.

Опыты удобно ставить в пенициллиновых флаконах, закрытых резиновыми пробками.

Метод серийных разведений.***

Инкубирование чистой культуры исследуемой расы дрожжей проводится в приборе, представляющем собой стеклянную бутылку с герметично закрывающейся трехходовой крышкой, исключающей испарение спирта при брожении. В сосуд наливается жидкая питательная среда и помещается стеклянный "поплавок" для последующей регистрации газообразования. Поплавок заполняется жидкой средой, прибор закрывается пробкой через марлевую салфетку и автоклавируется при 0,1 МПа в течение 20 минут.

В качестве субстрата используется глюкозно-дрожжевая среда, содержащая 5 % глюкозы и 0,3 % дрожжевого автолизата.

Далее в остывшую до комнатной температуры среду внести суточную сусло-культуру исследуемых дрожжей и этиловый спирт. Количество спирта

должно соответствовать серии разведений от 10,0 до 14,0 % и более (при необходимости) с шагом 0,5 %. В контрольную пробу спирт не вносить.

Жидкая питательная среда, дрожжевая взвесь и этиловый спирт дозируется точно в соответствии с произведенными расчетами заданной концентрации спирта.

После составления питательной среды бутылки плотно закрыть и для исключения ошибки дополнительно покрыть резиновыми колпачками.

Инокулированные дрожжевой взвесью спиртосодержащие среды поместить в термостат при 30°C и инкубировать в течение 72 часов, регистрируя результаты каждые 24 часа.

Результаты брожения учитывать по четырехкрестной системе, регистрируя объем жидкости, вытесненной из поплавка углекислым газом.

Показателем спиртоустойчивости считать наибольшую концентрацию спирта, при которой еще регистрируются признаки брожения.

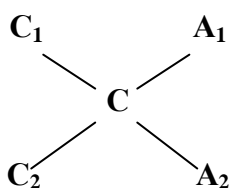
Для подтверждения результатов бродильной пробы по истечении 72 часов инкубации производятся посевы на сусло-агар из образцов с минимальным отрицательным результатом и выше.

Высокие концентрации этилового спирта в среде могут оказывать на дрожжевую клетку микостатическое действие, приводящее к остановке метаболических реакций брожения, но не гибель клетки. Микоцидные концентрации этилового спирта превышают концентрации микостатические.

Правило креста.

Правило смешивания растворов для получения заданной концентрации.

Для получения раствора заданной концентрации из двух растворов пользуются следующей схемой:



$$A_1 = C - C_2$$

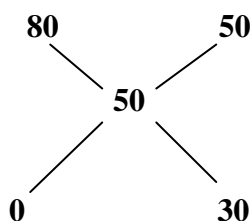
$$A_2 = C_1 - C$$

где

C – необходимая концентрация смеси, *C*₁ – концентрация раствора и *A*₁ – весовые количества раствора более высокой концентрации, *C*₂ – концентрация раствора и *A*₂ – весовое количество раствора более низкой концентрации.

Пример.

Из спирта крепостью 80 % необходимо получить 50 %-ный спирт. Как видно из схемы, для этого к 50 весовым частям 80 %-ого спирта прибавляют 30 весовых частей воды.



Кислотоустойчивость.

В годы, неблагоприятные для вызревания винограда, отдельные его партии могут поступать на переработку при величине рН сусла 2,5 – 2,9. Имеются наблюдения, что не все расы дрожжей могут полностью сбродить сахар в сусле с такой низкой кислотностью. Чтобы получить полностью выброженные высококислотные виноматериалы, рекомендуется применять кислотоустойчивые расы дрожжей.

Кроме того, одним из технологических приемов, предупреждающих инфицирование субстрата посторонней микрофлорой, является подкисление среды органическими или неорганическими кислотами. Важным при этом является использование рас, сохраняющих свои технологические свойства в кислой среде.

Нижняя граница рН устанавливается в соответствии с отраслевыми и технологическими особенностями.

Для отбора кислотоустойчивых культур для виноделия необходимо определять их бродильную способность в сусле с величиной рН 2,6 и содержанием сахаров 18 % при температуре 25° – 27°С. При отсутствии в лаборатории сусла с такими кондициями его можно получить подкислением 10 %-ным раствором винной кислоты и разбавлением водой обычного сусла с более высокой концентрацией сахаров и меньшей кислотностью.

Отбирают те расы дрожжей, которые начинают размножаться и сбраживают сусло быстрее и полнее других. В конце брожения необходимо определить остаточные сахара, чтобы убедиться в полном выброживании их в сусле с рН 2,6 отобранной культурой.

Методика постановки опытов и контроль за ходом брожения описаны в разделе «Бродильная активность».

Изменив сбраживаемый субстрат, температурный режим инкубации и величину рН описанный метод применим для исследования кислотоустойчивости дрожжей, используемых в других отраслях промышленности.

Установлено, например, что через 24 часа пивные дрожжи погибают при концентрациях кислот, указанных в Табл. 18.

Таблица 18

Предельно допустимые концентрации кислот для пивных дрожжей

<i>Кислота</i>	<i>Концентрация, %</i>
<i>Соляная</i>	0,14
<i>Азотная</i>	0,80
<i>Серная</i>	0,39
<i>Муравьиная</i>	0,17
<i>Щавелевая</i>	0,46
<i>Уксусная</i>	1,00

Флокуляция.

Большое значение имеет способность дрожжей к оседанию, во многом определяемая их флокуляционной способностью. От этого свойства дрожжей зависят степень сбраживания, осветление продукта, редукция диацетила и т. д.

Способность дрожжей к флокуляции определяют по скорости оседания и величине осадка за определенный период.

Определение флокуляционной способности.

Метод ЧССР.

Производственные семенные дрожжи, содержащие 3 г сухого вещества, смывают физиологическим раствором (0,85 %-ный раствор поваренной соли) в мерный цилиндр вместимостью 500 см³ и диаметром 5 см и доливают до объема 400 см³. После взбалтывания в течение 1 мин цилиндр оставляют в покое и через 12 мин определяют объем осевших дрожжей. Хорошие хлопьевидные дрожжи за это время образуют осадок высотой не менее 28 мм.

Метод Варна.

Дрожжи промывают водой и отпрессовывают на воронке, затем 5 г их переносят в колбу со 100 см³ дистиллированной воды и перемешивают. Затем 10 см³ суспензии переносят в градуированную центрифужную пробирку, добавляют 1 см³ уксуснокислого Na-ацетатного буферного раствора с рН 4,5, встряхивают до получения равномерной взвеси и оставляют в покое. Через 10 мин отмечают объем осадка дрожжей. Если

объем осадка больше 5 см^3 , дрожжи хорошо флокулируют, если объем осадка меньше 5 см^3 , дрожжи флокулируют слабо.

Метод Хельма.

Метод состоит в том, что дрожжи промывают водой и отпрессовывают на воронке, отбирают 1 г и переносят в градуированную центрифужную пробирку вместимостью 15 см^3 . Затем в эту пробирку добавляют 10 см^3 ацетатного буферного раствора, в 1000 см^3 которого содержится 0,51 г сульфата кальция, 6,8 г ацетата натрия и 4,05 г ледяной уксусной кислоты при pH 4,5. Дрожжи при центрифугировании хорошо промывают раствором, после чего суспензию выдерживают на водяной бане 20 мин при температуре 20°C . Затем содержимое пробирки тщательно взбалтывают до получения равномерной взвеси и оставляют в покое, отмечая величину осадка через равные промежутки времени.

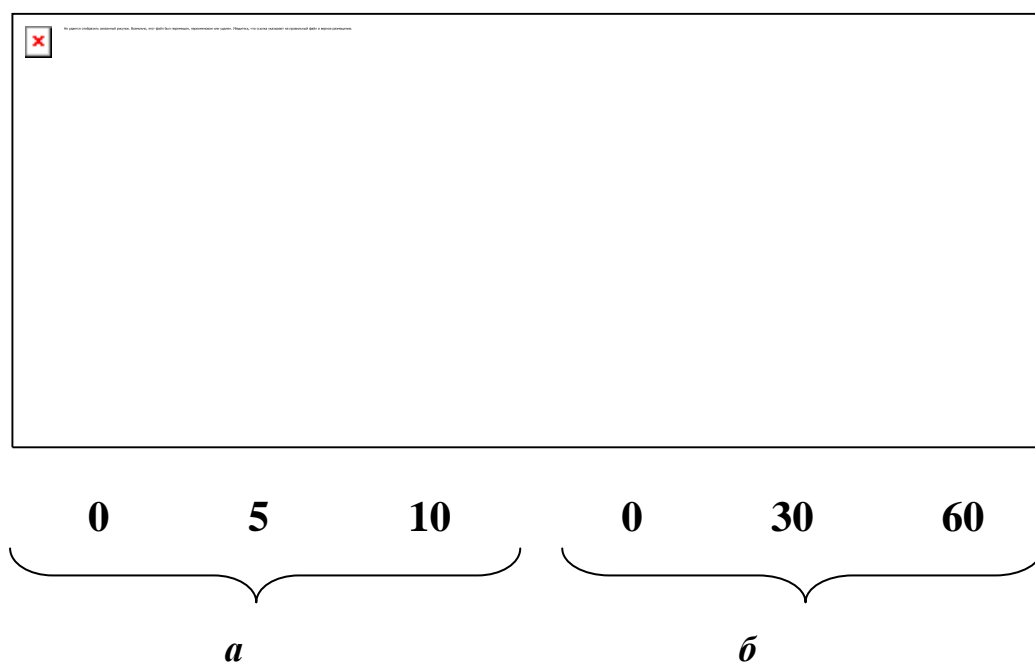


Рис. 33. *Характер образования осадка у дрожжей:*

*а – хлопьевидных;
б – пылевидных.*

Метод позволяет выявить различия между хлопьевидными и пылевидными дрожжами.

Суспензия хлопьевидных дрожжей быстро разделяется на два слоя, и уже через 10 мин образуется осадок, который постепенно уменьшается благодаря уплотнению. У пылевидных дрожжей осадок образуется лишь через 30 мин и со временем увеличивается за счет дополнительного оседания взвешенных клеток (Рис. 33).

Метод Иошида.

Дрожжи из расчета 2 – 3 млн. клеток в 1 см³ вносят в 250 см³ пивного сусла с концентрацией сухих веществ 8 % и культивируют 2 суток при 25°C. Сбраживаемое сусло тщательно перемешивают и по 10 см³ вносят в бутылки диаметром 6 см, содержащие по 190 см³ стерильного охмеленного сусла. Культивирование проводят при 11°C. Каждые сутки в бутылках измеряют оптическую плотность сбраживаемой жидкости на глубине 3 см от поверхности при $\lambda = 630$ нм и видимый или действительный экстракт.

Строят график: по оси ординат откладывают оптическую плотность, а по оси абсцисс – видимый или действительный экстракт. Полученная кривая характеризует флокуляционную способность дрожжей.

С точки зрения технологии следует обратить внимание на следующие параметры, характеризующие специфику процесса флокуляции:

- ❖ интенсивность;
- ❖ время наступления;
- ❖ скорость образования хлопьев;
- ❖ тип хлопьеобразования;
- ❖ оптимальные условия среды (температура, состав и т.д.).

По способности флокулировать пивные дрожжи сгруппированы в четыре класса:

1. Пылевидные дрожжи.

Эти дрожжи диспергированы в броющем сусле в течение всего брожения. В стационарной фазе они образуют скопления, состоящие из 10 и менее клеток.

2. Флокулирующие дрожжи первого класса.

Большую часть периода брожения клетки остаются во взвешенном состоянии. После сбраживания 2/3 экстракта, клетки начинают флокулировать с образованием хлопьев, состоящих из 1000 и менее клеток. Осадок дрожжей имеет плотную консистенцию со слегка размытой поверхностью.

3. Флокулирующие дрожжи второго класса.

Процесс флокуляции начинается после сбраживания 2/3 экстракта. Хлопья содержат до многих тысяч клеток. Осадок имеет плотную консистенцию.

4. Флокулирующие дрожжи третьего класса.

Процесс флокуляции начинается на ранних стадиях брожения.

Для производства пива низового брожения или лагерного пива используют штаммы дрожжей, относящиеся к 1 и 2 классу флокулирующих дрожжей. Способность дрожжей к флокуляции определяют любым, из вышеперечисленных методов. Согласно методу Хельма, хорошо флокулирующие дрожжи полностью оседают в растворе ацетатного буфера через 10 мин, в то время как пылевидные дрожжи – через 60 мин. При использовании метода, предложенного чешскими специалистами, дрожжи,

имеющие высокую флокуляционную способность, образуют осадок высотой 25 – 36 мм в стандартном объеме физиологического раствора в течение 12 мин.

Образование мицелия.

Образование мицелия и псевдомицелия изучают на кукурузном или картофельно-глюкозном агаре методом пластинок, или культур на стекле (*slide-culture*).

Кукурузный агар.

12,5 г кукурузной муки в 300 см³ водопроводной воды нагревают на водяной бане при 60°C в течение 1 ч, затем фильтруют через бумажный фильтр. Объем фильтрата доводят до 300 см³, добавляют 3,8 г агара и автоклавируют 15 мин при 121°C. Горячую среду еще раз фильтруют через вату, разливают по пробиркам и снова стерилизуют при том же режиме.

Картофельно-глюкозный агар.

100 г промытого, очищенного и измельченного картофеля вымывают в 300 см³ водопроводной воды в течение нескольких часов на холоду. Массу фильтруют через ткань и автоклавируют в течение 1 ч при 121°C. Для приготовления агаровой среды к 230 см³ этой жидкости добавляют 770 см³ водопроводной воды, 20 г глюкозы и 20 г агара и стерилизуют в автоклаве 15 мин при 112° С.

Приготовление препаратов.

Расплавленную среду наливают в чашки Петри и в нее, зажав пинцетом, опускают и быстро вынимают стерильные предметные стекла. Покрытые пленкой агара стекла помещают на U-образную стеклянную подставку в другой чашке Петри и оставляют до полного застывания среды.

Посевы делают тонкими штрихами: по три на каждой пластинке параллельно короткой стороне стекла или по одному вдоль длинной стороны стекла. Стерильные покровные стекла накладывают на штрихи так, чтобы под ними не было пузырьков воздуха и чтобы часть штриха осталась непокрытой. На дно чашки наливают стерильную воду во избежание пересыхания слоя агара на пластинке.

Через 6 – 8 дней инкубации при 25°C стекла вынимают и, предварительно очистив их нижнюю поверхность от агара, помещают на столик микроскопа для наблюдений. На таких препаратах не нарушается естественное расположение клеток псевдомицелия, бластоспор или артроспор.

Образование мицелия и псевдомицелия наблюдают в анаэробных (под покровным стеклом) и в аэробных (вне стекла) условиях.

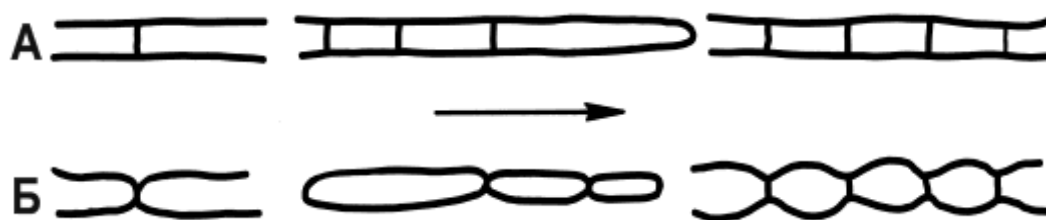


Рис. 34. *Различия между истинным (А) и ложным (Б) мицелием.*

Так как на практике зачастую бывает трудно отличить ложный мицелий от истинного, особенно в культурах, где есть и почкование и деление, то следует обращать внимание на следующее (Рис. 34):

- 1) граница между клетками истинного мицелия – резко преломляющая свет прямая перегородка; граница между клетками ложного мицелия представлена их изогнутыми концами и не отличается по преломлению света от боковых стенок гиф;
- 2) в истинных гифах концевые клетки обычно более длинные, чем предшествующие, а в нитях псевдомицелия – наоборот;
- 3) у истинного мицелия нет перетяжек в зоне перегородок, а на псевдомицелии эти перетяжки хорошо заметны.

Определение фенотипов киллер, нейтральный, чувствительный.

При описании различий между расами дрожжей сообщается о том, что все дрожжи *Saccharomyces* принадлежат к одному из трех фенотипов: киллер (*K*), нейтральный (*N*) или чувствительный (*S*).

Применение рас дрожжей определенных фенотипов (*K*, *N* или *S*) позволяет проконтролировать, в какой степени чистая культура, внесенная в нестерильное сусло, способна овладеть средой. Для этого необходимо определить процентное содержание дрожжей фенотипов *K*, *N*, *S* в спонтанно сбраживаемом сусле (контроль) и в отстоянном сусле, забродившем при внесении в него разводки чистой культуры дрожжей определенного фенотипа.

Техника определения фенотипов *K*, *N*, *S* состоит в следующем.

В чашки Петри разливают агаризованное (1,5 %) виноградное сусло за 2 – 3 суток до использования, чтобы оно слегка подсохло и затем хорошо впитывало нанесенные на него дрожжевые суспензии.

Лучше высушивать в стерильном боксе под УФ-лампой в течение 3 – 5 часов, поставив перевернутое дно чашки на ребро ее крышки. ***

При работе на виноградном сусле для предотвращения гидролиза агара его 3 %-ный водный раствор стерилизуют отдельно от сусла и смешивают при температуре 60 – 70°C в равных количествах.

Для лучшей контрастности зон подавления роста чувствительных культур в расплавленную среду можно добавлять перед розливом в чашки Петри

стерильный 0,5 %-ный водный раствор метиленового синего в количестве 1 см³ на 200 см³ среды.

Отдельную колонию штамма дрожжей, фенотип которого необходимо определить, изолируют иглой с плотной питательной среды и примерно в равном соотношении переносят на внутреннюю стенку пробирки с 0,5 см³ стерильной водопроводной воды и уколом на чашку Петри с газоном культуры фенотипа *S*.

На одну чашку можно нанести в определенной последовательности до 30 уколов исследуемых штаммов.

Стерильно готовят водные суспензии тех же колоний в пробирках с 0,5 см³ водопроводной воды и на других чашках Петри с сусло-агаром (без газона штамма фенотипа *S*). Делают петлей газоны исследуемых штаммов дрожжей диаметром около 1,5 см. На них в центр наносят уколом штамм фенотипа *K*, предварительно выращенный на сусло-агаре. На одну чашку можно нанести газоны десяти исследуемых штаммов в той же последовательности, что и на газоне штамма фенотипа *S*. Через 2 суток инкубации чашек Петри с посевами при температуре 25 – 28°C определяют фенотипы штаммов.

Если вокруг колоний образовались зоны на газоне чувствительного штамма, то штаммы идентифицируются как киллеры. Штаммы, на газонах которых киллер образует зоны, являются чувствительными, остальные – нейтральные.

В качестве тестеров (индикаторных культур) можно использовать киллер и чувствительные расы коллекционных культур *S. vini*.

Технологические критерии оценки.

Удельная скорость роста.

Для вычисления удельной скорости роста μ служит уравнение

$$\mu = \frac{\lg A/P \cdot 2,3026}{\tau}$$

или

$$\mu = \frac{\ln A/P}{\tau},$$

где

P – начальное содержание дрожжей (засев), кг;

A – содержание дрожжей в конце цикла, кг;

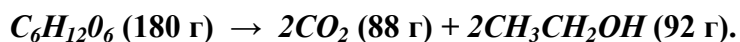
τ – длительность процесса, ч.

В реальном процессе на удельную скорость роста оказывает влияние множество независимых друг от друга факторов: качество питательной среды, конструкция и техническое состояние оборудования, активность засева, колебания температуры, pH среды и концентрации сахара, степень аэрации и др. Поэтому для определения реальной удельной скорости роста в конкретных условиях следует проанализировать результаты производственной деятельности методами математической статистики, с тем чтобы величины *A* и *P* были достоверными.

Бродильная активность.

Определение по скорости спиртового брожения.

О скорости брожения судят по количеству углекислоты, выделившейся в единицу времени из определенного объема среды:



Количество углекислоты устанавливают по убыли веса сосуда, снабженного затвором (Рис. 35).



Рис. 35. Колба с сернокислым затвором для брожения.

В колбы (или бутылки) наливают 11 %-ное неохмеленное сусло. Вносят в сусло исследуемую культуру до 7 – 10 млн. клеток в 1 см³. Количество введенных дрожжей определяют подсчетом клеток под микроскопом с помощью камеры Горяева. Колбы закрывают затворами, взвешивают и оставляют при температуре 28 – 30°C или температуре, соответствующей технологической. Колбы или бутылки взвешивают ежедневно до прекращения изменения массы.

Динамика выделения CO_2 при брожении

Время, ч	Вес колбы, г	Количество CO_2			
		от начала опыта		за интервал времени	
		г/100 мл	г/л	г/л	г/л/час
0					
6					
12					
18					
24					
и т. д.					

По разности начальной и конечной масс определяют бродильную активность дрожжей, выражая ее в граммах диоксида углерода, выделившегося из 100 см³ сусла.

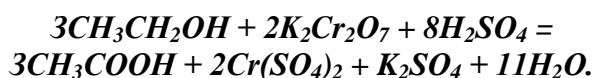
Рассчитывают, сколько граммов CO_2 выделилось из 1000 см³ среды в 1 ч за каждый интервал времени между взвешиваниями сосуда.

Для регистрации результатов можно использовать таблицу 20.

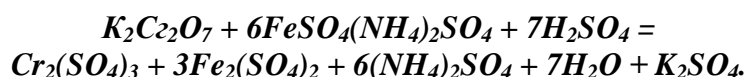
Более информативным и технологически верным будет пересчет граммов CO_2 , выделившихся из 1000 см³ среды в 1 ч на 1 млн. клеток засевных дрожжей. ***

Определение по количеству этанола.

Количество этанола, образовавшегося при брожении, определяют оксидиметрическим методом, основанным на окислении этилового спирта до уксусной кислоты и воды смесью бихромата калия с серной кислотой:



По окончании окисления спирта избыток бихромата оттитровывают раствором соли Мора:



По количеству бихромата, израсходованного на окисление, вычисляют концентрацию спирта. Наиболее точные результаты метод дает при содержании спирта в жидкости в пределах 1 – 2 %. Поэтому при более высоких концентрациях спирта разбавляют культуральную жидкость, а при меньших – растворы соли Мора и бихромата.

В мерную колбу на 100 см³ помещают 20 см³ культуральной жидкости, освобожденной от клеток декантацией, фильтрованием или центрифугированием. Содержимое колбы доводят до метки дистиллированной водой, перемешивают и берут 10 см³ в круглодонную колбу на 50 – 75 см³. В трехшариковый приемник наливают 25 см³ раствора бихромата и 10 см³ концентрированной H₂SO₄. Колбу плотно закрывают резиновой пробкой с отводной трубкой, суженный конец которой должен доходить почти до дна приемника (Рис. 36). Затем в течение 10 – 15 мин отгоняют две трети содержимого колбы. Раствор бихромата за это время меняет окраску от оранжевой до грязно-бурой. После отгонки во избежание обратного перебрасывания жидкости из приемника убирают приемник и только потом отставляют горелку.

Содержимое приемника переносят в мерную колбу на 100 см³. Дистиллированной водой споласкивают приемник и отводную трубку, и промывные воды выливают в ту же мерную колбу. После этого раствор в колбе доводят до метки дистиллированной водой, перемешивают, отбирают из него 20 см³ в коническую колбу на 250 см³, добавляют 20 см³ дистиллированной воды и титруют солью Мора. Параллельно ведут контрольное титрование, чтобы определить, сколько соли Мора идет на титрование 5 см³ раствора бихромата. Для этого в коническую колбу

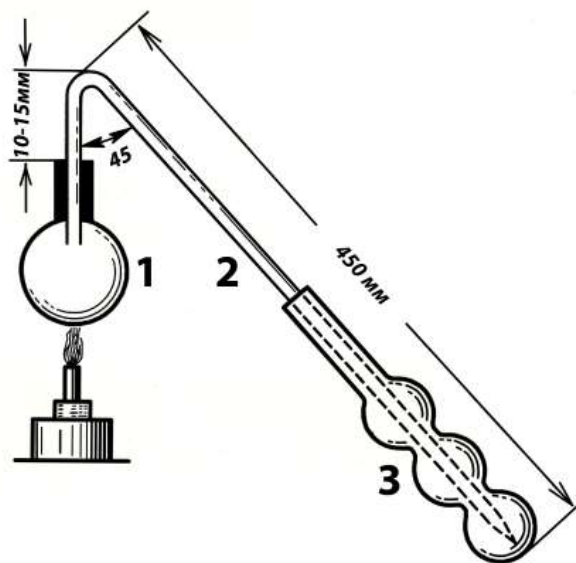


Рис. 36. *Прибор Мартена для определения спирта:*

1 – круглодонная колба; 2 – отводная трубка; 3 – приемник.

помещают 5 см³ раствора бихромата, 2 см³ концентрированной серной кислоты, 30 – 40 см³ дистиллированной воды и титруют солью Мора. Так как соль Мора нестойкое соединение, контрольное титрование обязательно делают при каждом определении. Конец титрования устанавливают капельной пробой с раствором феррицианида. Для этого на чистую белую

фарфоровую или керамическую пластинку стеклянной палочкой наносят каплю титруемой жидкости и рядом из капельницы каплю раствора феррицианида. Интенсивное синее окрашивание, получаемое при слиянии капель, указывает на конец реакции. Опытный раствор и контроль титруют по два раза. Первое титрование служит для получения ориентировочных результатов, поэтому реакцию титруемой жидкости с раствором феррицианида проводят после добавления каждого миллилитра раствора соли Мора. При втором титровании из бюретки сначала сливают без пробы на индикатор большую часть того количества раствора соли Мора, которое было определено первым титрованием, а затем делают качественную реакцию каждый раз после добавления $0,1 \text{ см}^3$ раствора соли Мора.

Количество этанола ($\text{г}/10 \text{ см}^3$) в культуральной жидкости рассчитывают по формуле:

$$M_{\text{этанол}} = \frac{(a - б) \cdot 25 \cdot 5}{a} \cdot 0,01,$$

где

- a*** – см^3 раствора соли Мора, пошедшие на титрование контроля;
- б*** – см^3 раствора соли Мора, пошедшие на титрование опыта;
- 25** – $\text{см}^3 \text{ K}_2\text{C}_2\text{O}_7$;
- 5** – разведение культуральной жидкости (20 см^3 до 100 см^3);
- 0,01** – грамм этанола соответствует $1 \text{ см}^3 \text{ K}_2\text{C}_2\text{O}_7$.

Объемный способ.

Метод основан на том, что состав суслу не всегда одинаков и определение бродильной энергии дрожжей целесообразнее проверять на растворе какого-либо сахара. Прибор, применяемый для этой цели, состоит из колбочки емкостью 50 см^3 , присоединенной резиновой трубки, бюретки, и уравнительного сосуда. Бюретку и уравнительный сосуд заполняют 20 %-ным раствором NaCl, подкисленным ортофосфорной кислотой до pH 1,0. Этот раствор почти не поглощает CO_2 . В колбочку помещают трехсуточную культуру дрожжей (выращенных на сусло-агаре) промытых и отпрессованных между листками фильтровальной бумаги. В навеске должно содержаться около 0,15 г сухих веществ (определенный вес, например 0,7 г с влажностью около 75 %). Затем в колбочку наливают 30 см^3 10 %-ого раствора сахара (глюкозы), содержащего 0,2 % KH_2PO_4 . Колбочку закрывают пробкой и из бюретки вытесняют воздух, пользуясь уравнительным сосудом. Уровень раствора в бюретке уравнивают на ноль. После этого поворотом трехходового крана соединяют емкость колбочки с бюреткой и начинают процесс брожения, который ведут при

температуре 20°C в течение 3 часов. Через каждый час уровень жидкости в бюретке отмечают и устанавливают на ноль.

По объему образовавшегося CO_2 за 3 ч (по сумме трех объемов) судят о бродильной способности дрожжей. Хорошо бродящие дрожжи за 3 ч образуют около $30 \text{ см}^3 \text{ CO}_2$.

Манометрический метод определения бродильной активности.***

Для определения бродильной активности дрожжей используется прибор, состоящий из колбы (объем 300 – 500 см^3), газоотводной трубки с краном и чувствительного манометра (медицинский для определения артериального давления) (Рис. 37).

Перед началом работы измеряют объем используемой колбы до нижнего края тщательно притертой пробки и объем газоотводной трубки. Для этого заполняют колбу и трубку водой, затем мерным цилиндром измеряют объем вместилившейся жидкости.

Воспользовавшись уравнением Менделеева-Клапейрона определяют необходимую величину давления в свободном объеме используемой колбы. Порядок расчета величины давления описан в разделе «Зимазная, инвертазная и мальтазная активность. Манометрический способ.***»

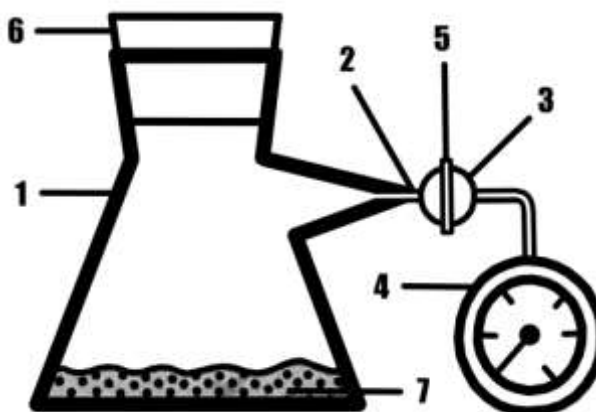


Рис. 37. Прибор для брожения:

1 – колба, 2 – газоотводная трубка, 3 – краник, 4 – манометр, 5 – подвижная часть краника, 6 – пробка, 7 – дрожжевая суспензия.

Например, для оценки бродильной активности пивных и винных дрожжей регистрируется 28 – 30 $\text{см}^3 \text{ CO}_2$. Такое количество газа хорошими дрожжами выделяется не более чем за 3 часа.

В колбу вносят 0,7 г отпрессованных на воронке дрожжей, 30 см^3 солодового сусла (8 – 10 % СВ) или 10 %-ого раствора сахара и взбалтывают до получения однородной суспензии. Колбу тщательно закрывают и через газоотводную трубку соединяют с манометром. Для уравнивания давления в колбе с атмосферным давлением извлекают подвижную часть краника и сразу помещают на место тщательно притерев и совместив отверстия.

Подготовленный таким образом прибор переносят в термостат при температуре, соответствующей технологической, и регистрируют время, за которое стрелка манометра достигнет необходимой отметки, соответствующей определяемому количеству выделенного диоксида углерода.

Степень сбраживания.***

Конечная степень сбраживания является не только важным показателем технологической оценки углеводного состава сусла, но и характеризует физиологические возможности исследуемых дрожжей, имеющие решающее значение в оптимизации технологического процесса.

Метод основан на экспериментальном сбраживании дрожжами субстрата с последующим установлением количества сброженных сахаров.

В зависимости от поставленной задачи и особенностей исследуемой расы дрожжей начальная концентрация СВ в субстрате может колебаться от 15 до 20 и более %.

Для того чтобы исключить влияние состава сусла на результаты эксперимента можно использовать среду постоянного состава:

Глюкоза (сахароза, мальтоза)	150 – 200 г
Дрожжевой автолизат	5,0 см ³
Биотин	0,02 см ³
Вода	до 1000,0 см ³

Приготовленный субстрат разлить в бутылки по 200 см³ и туда же внести по 0,5 г отпрессованных на воронке исследуемых дрожжей. Тщательно перемешать до однородной суспензии и инкубировать. На каждую культуру готовить по 10 бутылок и определять степень сбраживания с интервалом 6 – 12 – 24 и более часа.

Температурный режим инкубации может быть оптимальным для дрожжей – 28 – 30°С или же устанавливаться в зависимости от технологических особенностей.

Измерение вести до трех одинаковых результатов, первый из которых считать конечной степенью сбраживания. Перед измерением плотности субстрат фильтровать через бумажный фильтр, возвращая в воронку первые порции.

Конечную степень сбраживания, показывающую количество в сусле сброженных веществ, считают в процентах к их массе в исходном субстрате по формуле:

$$X = \frac{(m_{CB} - m_{CB_1}) \cdot 100}{m_{CB}},$$

где

m_{CB} – массовая доля сухих веществ в начальном субстрате, %;

m_{CB_1} – видимая массовая доля сухих веществ в субстрате на момент измерения, %.

Регистрировать:

- конечную степень сбраживания,
- скорость сбраживания,
- динамику сбраживания, выраженную графически.

Подъемная сила.

Подъемная сила — основной показатель качества хлебопекарных дрожжей; чем быстрее дрожжи поднимают тесто, тем выше их качество. Хорошие дрожжи поднимают тесто за 60 – 65 мин. В соответствии с требованиями стандарта подъемная сила товарных дрожжей не должна превышать 75 мин.

Следует помнить, что подъемная сила дрожжей может несколько изменяться в зависимости от влажности и качества муки.

Подъемная сила прессованных дрожжей.

Стандартный метод.

280 г пшеничной муки 85 %-ого помола помещают в термостат при температуре 35°C не менее чем на 2 часа. Затем подогревают до 35°C 160 см³ 2,5 %-ого раствора поваренной соли, 5 г анализируемых прессованных дрожжей, отвешенных на технических весах с точностью до 0,01 г, смешивают в фарфоровой чашке с 15 – 20 см³ подготовленного, как указано выше, раствора поваренной соли до исчезновения комков. Разведенные дрожжи быстро вливают в дежу лабораторной тестомесильной машины с частотой вращения 135 об/мин. Оставшимся раствором соли ополаскивают чашку из-под дрожжей и тоже выливают в дежу. Затем насыпают 280 г согретой муки и включают тестомесильную машину.

Через 5 мин тестомесильную машину останавливают, вынимают тесто, придают ему форму батона и кладут в металлическую форму, также предварительно нагретую в термостате при 35°C и смазанную растительным маслом.

При отсутствии месильной машины тесто замешивают вручную, соблюдая указанный выше режим его приготовления.

Форма должна иметь в продольном и поперечном разрезах трапецию следующих внутренних размеров (в см): верхние основания 14,3 × 9,2, нижние — 12,6 × 8,5, высота — 8,5. На длинные борта ее навешивают поперечную металлическую перекладину, входящую в форму на 1,5 см.

Пробу ставят в термостат с температурой 35°C и фиксируют время. Когда тесто коснется нижнего края перекладки, вновь отмечают время.

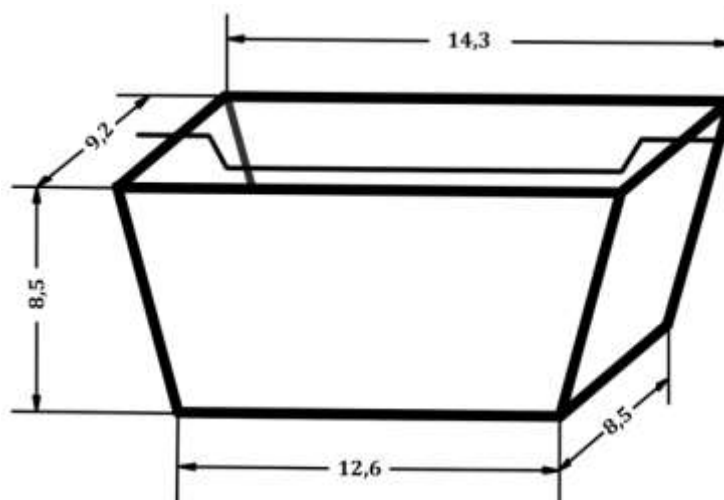


Рис. 38. Форма для определения подъемной силы дрожжей.

Скоростью подъема теста, или подъемной силой, считают продолжительность (в минутах) нахождения теста в форме с момента внесения его до соприкосновения с нижним краем перекладки.

Хорошие дрожжи показывают подъемную силу не более 60 – 65 минут.

«По шарик»

Навеску дрожжей массой 0,31 г перемешать в ступке с 4,8 см³ подогретой до 35°С воды. Добавить 7,0 г муки II сорта и быстро замешать, придав замесу форму шарика, не прилипающего к рукам. Шарик погрузить в стакан с водой температурой 32°С. Стакан поместить в термостат при 32°С.

Регистрировать время от погружения до всплытия шарика.

Хорошие дрожжи показывают подъемную силу не более 25 минут.

Время, затраченное на всплывание шарика (мин), умножают на коэффициент 3,5 и получают величину подъемной силы, определяемую стандартным способом.

Подъемная сила сухих дрожжей.

К навеске сухих дрожжей (2,5 г), взятой на технических весах, добавляют 30 см³ водопроводной воды, нагретой до 35°С. Смесь помещают в термостат при температуре 35°С на 30 мин. К размокшим дрожжам добавляют 15 г пшеничной муки II сорта, тщательно размешивают и вновь ставят в термостат на 2 часа. Одновременно в термостат помещают 265 г муки того же сорта, 130 см³ воды, в которой растворено 4 г поваренной соли, и стандартную форму (Рис. 38), смазанную растительным маслом. Через 2 часа смесь дрожжей, воды и муки переводят в дежу лабораторной тестомесильной машины (или большую фарфоровую чашку), смывая остатки смеси 130 см³ солевого раствора, после чего засыпают 265 г согретой муки. Тесто замешивают в течение 5 мин с момента внесения дрожжей, затем

переносят его в форму и далее поступают так же, как при определении подъемной силы прессованных дрожжей.

Сульфитостойкость винных дрожжей.

Способ 1.

Для сравнительного изучения сульфитостойкости различных культур дрожжей их нужно подвергнуть действию одинаковой дозы свободной SO_2 . Сульфитостойкие расы можно отбирать по скорости забраживания виноградного сусла, содержащего 100 мг/дм^3 свободной SO_2 в момент внесения в сусло разводов изучаемых культур.

Вначале проводят пробную сульфитацию сусла разными дозами SO_2 и выбирают такую, при которой через час после внесения SO_2 в сусло в нем будет содержаться около 100 мг/дм^3 свободной сернистой кислоты. Сразу после сульфитации содержание ее быстро уменьшается, так как она вступает в соединение с составными частями сусла (сахарами, альдегидами и др.), а спустя 1 – 2 ч ее количество уже заметно не меняется. Затем сульфитируют сусло выбранной дозой SO_2 в склянке вместимостью 2000 см^3 с нижним тубусом, склянку закрывают, сусло перемешивают и оставляют на час.

За это время в стерильные небольшого объема склянки, размеченные до стерилизации по 20 см^3 , вносят по $0,2 \text{ см}^3$ двухсуточных разводов исследуемых рас дрожжей. Каждую культуру вносят в три склянки, т. е. опыты ставят в трех повторениях.

Через час после сульфитации сусло из 2-литровой склянки разливают через нижний тубус по 20 см^3 в склянки быстро, но осторожно, чтобы оно не разбрызгивалось. Для предотвращения улетучивания SO_2 склянки закрывают резиновыми пробками, обработанными спиртом, и затем ставят в термостат при температуре 27°C . При такой постановке опыта все культуры дрожжей подвергаются действию одинаковой дозы свободной SO_2 . Ежедневно в течение 10 дней опытные склянки просматривают и отбирают сульфитостойкие расы дрожжей по скорости размножения и забраживания сусла.

Способ 2.

Быстрее и проще можно определять сульфитостойкость по скорости размножения штаммов дрожжей на сульфитированном виноградном сусло-агаре в чашках Петри. Сусло перед розливом в чашки Петри смешивают с равным количеством 3 %-ого водного агара. В связи с невозможностью определять содержание сернистой кислоты в сусло-агаре для подбора дозы сульфитации виноградное сусло в нескольких контрольных порциях смешивают с таким же количеством водопроводной воды (вместо 3 %-ого водного агара). Разбавленное сусло в склянках сульфитируют несколькими дозами крепкого водного раствора сернистой кислоты для того, чтобы можно

было выбрать дозу сульфитации, при которой через час после внесения SO_2 в сусло, а также в сусло-агаре будет содержаться около 100 мг/дм^3 свободной сернистой кислоты. Содержание свободной сернистой кислоты определяют йодометрическим методом.

Штаммы исследуемых дрожжей предварительно выращивают в течение 2 суток в виноградном сусле при температуре 27°C , а затем уколом иглы наносят на поверхность сульфитированного сусло-агара в количестве 25 штаммов на чашку. Кончик иглы для этого погружают в разводки исследуемых культур примерно на 1 см. Чашки Петри с посевами помещают в термостат и выдерживают при температуре 27°C . Ежедневно, в течение недели, просматривают чашки Петри и отбирают сульфитостойкие штаммы, колонии которых вырастают раньше.

Первичный отбор проводится при содержании свободной сернистой кислоты 100 мг/дм^3 , а затем наиболее сульфитостойкие штаммы отбирают при содержании ее 150 мг/дм^3 .

Для получения более объективной информации следует использовать микроскопические методы оценки состояния исследуемых культур дрожжей.

Технологическая устойчивость культуры – «автолизное число».***

Для оценки степени устойчивости дрожжевой культуры к неблагоприятным факторам питательной среды может использоваться тест для определения технологической стойкости дрожжей – "автолизное число".

Тест основан на определении количественной разницы в среде аминно-аммонийного азота между двумя измерениями с учетом прироста клеточной массы. Ввиду того, что стадии разбраживания и активного брожения (лаг-фаза \Rightarrow фаза логарифмического роста) сопровождаются активным приростом пока еще здоровой клеточной массы, а значит активным потреблением доступного азота, измерения следует начинать по завершении стадии активного брожения – при переходе культуры в стационарную фазу \Rightarrow фазу затухания \Rightarrow гибели. Интервал между измерениями может быть выбран произвольно в течение всего периода брожения.

Суть предлагаемого теста видна из формулы:

$$A = \frac{N_2 - N_1}{(K_2 - K_1) \times 0,1},$$

где

A – автолизное число;

N_1 – количество усвояемого азота начальное;

N_2 – количество усвояемого азота конечное;

K_1 – концентрация дрожжей начальная;

K_2 – концентрация дрожжей конечная.

Т.е. "автолизное число", выражает увеличение/уменьшение количества аминно-аммонийного азота в среде на 10 млн./см^3 клеток дрожжей между двумя измерениями.

Полученные результаты могут регистрироваться на графике, отображающем время брожения и величину автолизного числа.

Избыточное увеличение аминно-аммонийного азота, или высокий показатель автолизного числа, может свидетельствовать о высокой интенсивности автолизных процессов и, как следствие, слабости или дефектности очередной генерации или культуры вообще.

Вместе с тем, чем больше автолизное число, тем больше биомасса подвержена воздействию неблагоприятных факторов среды, с точки зрения ее физико-химических параметров.

Тест и более информативен, и более объективен, нежели простой подсчет процентного соотношения живых и мертвых клеток, который на сегодняшний день в производственных лабораториях является единственным критерием оценки жизнеспособности культуры. Данный анализ позволяет не только констатировать факт гибели клетки, но и оценить степень её деструктивных изменений, учесть весь массив факторов, воздействующих на дрожжевую клеточную массу в процессе брожения с учетом технологических особенностей конкретного предприятия.

Изменяя те или иные параметры брожения по показателю автолизного числа можно определить жизнеспособность клеточной популяции в конкретных физико-химических условиях среды.

Формольное число.

Усвояемый азот в среде определяется формольным титрованием. Сущность метода заключается в том, что формалин реагирует с аминогруппами большинства аминокислот и вытесняет серную кислоту из аммонийных соединений. Образующиеся метиленаминогруппы и серная кислота оттитровываются щелочью.

Способ 1.

10 см^3 среды через бумажный фильтр отфильтровывают от дробины и дрожжей, разбавляют дистиллированной водой до 100 см^3 и титруют $0,1 \text{ Н}$ раствором NaOH с фенолфталеином до слаборозового окрашивания. Затем туда же вносят $5,0 \text{ см}^3$ нейтрального формалина и вторично титруют тем же раствором NaOH до слаборозового окрашивания.

Количество миллилитров $0,1 \text{ Н}$ NaOH , пошедшее на вторичное титрование, называют формольным числом исследуемой жидкости, и является величиной относительной.

Чтобы выразить формольное число в абсолютных величинах растворенного в среде аминного и аммонийного азота нужно формольное

число умножить на коэффициент 0,0014, т.е. 1 см³ 1 Н раствора NaOH соответствует 0,014 г азота в 1000 см³ среды.

Способ 2.

В стакане взвешивают $25 \pm 0,01$ г питательной среды и навеску теплой дистиллированной водой, освобожденной кипячением от CO₂, переводят в мерную колбу на 100 см³.

Раствор охлаждают до 20°C, доводят водой до метки и перемешивают.

В химический стакан отбирают пипеткой 20 см³ полученного раствора и титруют 0,1 Н раствором щелочи до pH = 7,0. Затем сюда же приливают 5 см³ формольной смеси и продолжают титрование до pH = 9,1.

Для контрольного титрования в химический стакан отмеривают 20 см³ дистиллированной воды и 5 см³ формольной смеси и также титруют до pH = 9,1.

Содержание аминно-аммонийного азота рассчитывают по формуле:

$$N = 0,0014 \cdot (a - b) \cdot 100 : H,$$

где

N – усвояемый азот (%);

a – объем 0,1 Н щелочи, пошедшей на титрование 20 см³ раствора питательной среды (см³);

b – то же, на титрование контрольной пробы (см³);

H – навеска питательной среды в 20 см³ раствора (г).

Например: $N = 0,0014 \cdot (11,2 - 0,2) \cdot 100 : 5 = 0,31 \%$

Формольная смесь.

1. Формалин, х.ч. 50,0 см³

2. Фенолфталеин, 1 % 1,0 см³

Оттитровать 0,1 Н NaOH до слаборозового окрашивания.

Пригодна в течение 2 – 3 дней.

Подготовка дрожжей к брожению.

Лабораторная стадия разведения.***

Разведение чистой культуры дрожжей осуществляется путем последовательного пересева с доведением объема среды до производственной дрожжанки или дрожжегенератора. Оптимальным режимом прироста объема среды принято считать шаг 1 : 10.

Лабораторная стадия разведения дрожжевой культуры требует неукоснительного соблюдения следующих условий:

1. Обязательное сохранение чистоты культуры;
2. Максимально возможная сбалансированность питательной среды;

3. Постепенный переход физико-химических параметров культивирования от лабораторных к технологическим, с целью поддержания щадящих режимов адаптации.

Очередную разводку можно начать культурой на скошенном агаре, смыв ее солодовым суслом или физ. раствором. Для этого в пробирку с дрожжами вносят 5 – 10 см³ стерильной жидкой среды и выдерживают в термостате при 28 – 30°С в течение 2 – 3 часов. После непродолжительного инкубирования содержимое пробирки перемешивают между ладонями, смывая дрожжевой рост с поверхности агара.

Такой вариант экономит несколько дней, однако имеет существенные недостатки:

1. Нет подтверждения чистоты культуры, особенно, если пробирка с дрожжами хранилась длительное время;
2. Нет возможности отбора наиболее активной колонии по культуральным и ферментативным свойствам.

Исключить возможные ошибки можно, начав разводку с пересева коллекционной культуры используемых дрожжей на поверхность сусло-агара в чашке Петри.

Инокулят отбирается петлей с поверхности косого агара и рассеивается штрихом непосредственно в чашку Петри, либо предварительно вносится в жидкую среду, перемешивается до однородной суспензии и рассеивается истощающим штрихом. Чашки инкубируются при 28 – 30°С в течение 5 – 7 дней. По окончании инкубации при малом увеличении тщательно отбираются 2 – 3 лучшие по культуральным свойствам колонии, из которых в разводку пойдет наиболее активная по ферментативным свойствам (см. **«Метод отбора наиболее активной культуры»**). Отсев на скошенный агар от этой колонии можно смыть жидкой средой, как указано выше.

Полученную в пробирке дрожжевую суспензию стерильно переливают в колбу с 50 см³ стерильного солодового сусла с 0,3 % дрожжевого автолизата и инкубируют 22 – 24 часа при 28 – 30°С.

На следующем этапе объем среды доводят до 500 см³, при этом 1/2 ее часть следует заменить стерильным производственным суслом (виноградное сусло, меласса и др.). Стерильно переносят в нее содержимое предыдущей колбы. Температурный режим и время инкубации те же.

Объем среды на следующем этапе составит 5000 см³, 1/2 ее часть следует снова заменить стерильным производственным суслом. Если технологические параметры предусматривают низкие температуры брожения, следует на этом этапе для инкубации выбрать промежуточный температурный режим.

На следующем этапе объем среды увеличивается в 10 раз, и снова 1/2 его объема заменяется производственным суслом. Автоклавирование такого объема может представлять определенные трудности, поэтому для предупреждения инфицирования следует прибегнуть к дополнительному дробному кипячению в течение двух дней или использованию

противомикробных препаратов в бактерицидных дозах. Температура инкубации должна соответствовать технологическим параметрам.

Дальнейшие процедуры определяются особенностями аппаратурно-технологической схемы конкретного производства и его регламентом, предписывающим порядок ведения ЕЧК.

На всех этапах лабораторной стадии разводочного цикла целесообразно включать в состав питательных сред факторы роста и биологически активные добавки.

В частности, в пивоварении активирование дрожжей перед введением в сбраживаемый субстрат рекомендуется осуществлять несколькими способами.

1. Дрожжи разбавляют в соотношении 1:1 стерильным аэрированным суслом при 15 – 17,5°C, после чего смешивают только с частью (1/4 – 1/3) холодного сусла во избежание охлаждения дрожжей, которое задерживает их рост и может усилить развитие посторонней микрофлоры.

2. Через 24 ч после введения дрожжей забродившее сусло смешивают со свежим суслом (1 : 1). Жидкие дрожжи вводят в сусло из расчета 11 – 18 % на сухое вещество от общего количества сухих веществ в сусле.

3. Заливают дрожжи первым суслом на 2 – 4 ч для увеличения содержания гликогена в клетках.

4. Вносят в дрожжи водные вытяжки или экстракты солодовых ростков, богатых биологически активными веществами и азотом.

Для введения в следующий цикл брожения используют здоровые активные производственные дрожжи.

Методы реактивации сухих дрожжей.

Эффективные способы восстановления жизнеспособности высушенных дрожжевых клеток имеют большое значение при определении комплекса показателей жизнеспособности сушеных дрожжей – ферментативной активности, подъемной силы и содержания в них мертвых клеток.

Правильно проведенная регидратация сухих дрожжей в щадящем осмотическом режиме так же имеет важное значение для их дальнейшего производственного использования.***

Размачивание дрожжей при повышенной температуре.

Навеску дрожжей 2,5 г размачивают в 30 см³ воды температурой 40 – 43°C, в остальном поступают так же, как при определении подъемной силы и других характеристик прессованных дрожжей.

Предварительное обводнение.

2,5 г (в зависимости от поставленной задачи массу навески можно изменить) дрожжей, подлежащих анализу, помещают на 2 ч во влажную

камеру (в чашку Петри, на дно которой положен кружок фильтровальной бумаги, обильно смоченный водой) при температуре 30 – 35°C, через 2 ч увлажнившиеся дрожжи переносят в фарфоровую чашку или стаканчик и заливают 30 см³ воды температурой 40 – 43°C и далее поступают в соответствии с воспроизводимой методикой.

Реактивация винных сухих дрожжей.

В виноделии находят применение сухие дрожжи взамен жидких разводов. Применение их значительно снижает стоимость приготовления разводки в больших количествах.

Фирма *Эрбсле* («*Erbsloh*») по производству сухих дрожжей Гайзенхайм (Германия) рекомендует дозирование препаратов сухих дрожжей в зависимости от условий технологии: 10 – 15 г/100 дм³ сусла при температуре 15°C и выше; 20 – 25 г/100 дм³ при температуре 13°C и ниже (1 г сухих дрожжей содержит 25 миллиардов клеток).

Регидратацию сухих дрожжей (весовое необходимое количество) рекомендуется проводить в зависимости от условий виноделия (температура, качество винограда) по двум схемам:

Таблица 21

Схемы регидратации сухих дрожжей

I	II
Смешать в 10-кратном количестве теплой (35°C) смеси сусла-вода 1:1.	Смешать с 5-кратным количеством теплой (макс. 35°C) воды.
Хорошо перемешать и выдержать 30 мин.	Хорошо перемешать и выдержать 30 мин.
Повторно перемешать.	Добавить такое же количество сусла и перемешать.
Медленно (около 1 ч) охладить до температуры сусла в резервуаре.	Медленно (около 1 ч) охладить до температуры сусла в резервуаре.
Перемешать и добавить в резервуар.	Перемешать и добавить в резервуар.

Для обеспечения полного активного сбраживания сусла рекомендуются в качестве дополнительного питания дрожжей препараты, содержащие соединения азота – (NH₄)₂HPO₄, углеводов, минеральных веществ и витаминов – витамина В₁ (тиамина).

Реактивация спиртовых сухих дрожжей.***

Технология производства товарных дрожжей для любой из отраслей бродильной промышленности – это во всех отношениях максимально

сбалансированный процесс. Однако завершающий этап этого процесса – сушка, является процедурой крайне жесткой, наносящей клетке серьезные, а часто необратимые повреждения на биомолекулярном уровне. Вызваны такие нарушения воздействием на клетку высокой температуры при быстром удалении внутриклеточной влаги. Наибольшему повреждению подвержена клеточная стенка, в которой нарушается пористость, деградируют транспортные и ферментные системы, резко повышается осмотическая чувствительность.

Возвращение клетки к нормальной, на сколько это возможно, физиологической активности должно происходить постепенно с учетом вышеперечисленных обстоятельств.

Для регидратации вместо проточной воды рекомендуется использовать физиологический раствор (0,9 % раствор NaCl в дист. воде), который является изотоническим и не вызывает функциональной перегрузки биологических мембран при восстановлении влажности.

Регидратацию лучше проводить при низких температурах (2 – 4°C), т.к. из поврежденных в процессе сушки клеток в раствор выходит значительное количество лизирующих ферментов, восстанавливающих свою активность при высоких температурах и вызывающих более или менее серьезные повреждения клеточных стенок живых дрожжей.

Для полного удаления ферментов этой группы и мертвых клеток из суспензии целесообразно применять процедуру промывания регидратированных дрожжей.

Гарантировать бактериологическую чистоту процесса регидратации можно при соблюдении всех правил работы с чистой культурой и использовании противомикробных препаратов в соответствующих дозах.

На основании вышеизложенного рекомендуется стадию регидратации проводить следующим образом:

1. Необходимое количество сухих дрожжей рассыпать равномерно по всей площади зеркала холодного физ. раствора (с антибиотиком) в соотношении 1 : 30 – 1 : 50 и без перемешивания дать отстояться в холодильнике до полного увлажнения и образования стабильного осадка.

2. Осторожно слить надосадочную жидкость и снова залить холодным физ. раствором. Процедуру повторить 2 – 3 раза.

3. Для разбраживания использовать только тщательно промытый дрожжевой осадок.

Разбраживание предпочтительнее проводить в низкоконцентрированной, тщательно сбалансированной питательной среде в маточнике, оснащенном системой интенсивной аэрации стерильным воздухом и при жестком контроле температуры в пределах 28 – 30°C.

При соблюдении таких условий будут решаться несколько задач:

1. Аэробная стадия метаболизма.
2. Максимально возможное восстановление генеративной и бродильной активности для последующих стадий технологического процесса (дрожжанка, бродильный чан).

3. Щадящий режим разбраживания.
4. Интенсивный прирост биомассы.

Непременным условием культивирования дрожжей на этой стадии является биологическая чистота. Добиться этого можно либо дополнительным кипячением сусла, либо использованием противомикробных препаратов.

Культивирование дрожжей в дрожжанках является последним и основным звеном в формировании здоровой, физиологически активной дрожжевой массы. На этой стадии дрожжи перестраиваются на интенсивное брожение, которое с максимальной эффективностью должно проявиться в период главного брожения. Достижению этой цели способствуют:

1. Сбалансированность питательной среды по всем параметрам.
2. Биологическая чистота процесса.
3. Оптимальный температурный режим.
4. Оптимальная засевная доза.

Для дрожжевого отделения в качестве источника азота предпочтительнее использовать соответствующие дрожжевые препараты вместо общепринятого карбамида, или хотя бы часть его заменить такими препаратами.

В питательную среду необходимо включать препараты веществ, относящиеся к группе факторов роста.

Энергетически неэффективные и физиологически жесткие анаэробные условия культивирования необходимо сглаживать соответствующими препаратами, позволяющими дрожжам даже без доступа кислорода активно размножаться, сохраняя общий физиологический потенциал.

Температурный режим культивирования (28-30°C) должен соответствовать нормальной скорости течения внутриклеточных биохимических процессов и не ставить клетку в условия гиперфункционирования со всеми вытекающими последствиями (быстрая деградация культуры, ранние автолизные процессы, образование большого количества токсичных продуктов незавершенного метаболизма).

Крайне важно, что соблюдение температурного режима позволит значительно замедлить рост посторонней микрофлоры и создать условия для доминирования дрожжевой клеточной биомассы. Ввиду короткого периода дрожжегенерации влияние посторонней микрофлоры в дрожжанке не всегда заметно. Но, получая здесь развитие, она в огромных инфицирующих количествах переносится в бродильный чан, где в полной мере проявляет свое негативное влияние на ход и качество брожения.

Проверка чистоты культуры.

Время от времени культуры, как в коллекциях, так и в промышленности проверяют на наличие загрязнений или на появление мутантов.

Перед использованием в производстве пробы засевных дрожжей должны пройти проверку на жизнеспособность. Считается правильным проверять каждую партию семенных дрожжей на допустимое количество (а лучше всего вообще отсутствие) контаминирующих бактерий и диких дрожжей. Для бактерий рекомендуется использовать в основном актидионовый WL-агар или другие среды дифференциального назначения, а для диких дрожжей (не *Saccharomyces*) – лизиновый агар. Для обнаружения «диких» дрожжей среди сахаромисцетов делают рассев репликатором на лизиновый агар (углеродная основа + 0,1% L-лизина как единственного источника азота), на котором *S. cerevisiae* и *S. carlsbergensis* не растут, а «дикие» дрожжи растут. Но если контаминанты *Saccharomyces* окажутся стойкими к циклогексимиду (что встречается довольно редко), определить их будет невозможно. Однако следует иметь в виду, что не существует такой селективной среды, которая бы одновременно подавляла рост культурных дрожжей и допускала бы развитие всех присутствующих контаминантов. Тем не менее, дикие дрожжи рода *Saccharomyces* образуют споры и могут быть выделены благодаря своей теплостойкости (сравнительно с неспорообразующими культурными дрожжами). При этом, однако, для инкубации требуется не менее 3 суток, а задерживать на это время внесение дрожжей непрактично. Таким образом, этот анализ может служить лишь для проверки качества постфактум.

Petite или RD-мутанты (дефектные по дыханию) на сусло-агаре образуют окрашенные мелкие колонии. На среде с теллуритом они не восстанавливают последний.

Просмотр культуры под микроскопом.

Контролю подвергают односуточную культуру из жидкого солодового сусла плотностью 10 – 12 % СВ. Одну каплю культуры при помощи стерильной пипетки наносят на чистое предметное стекло и накрывают покровным стеклом (оба стекла предварительно протирают спиртом).

Приготовленный препарат помещают на предметный столик микроскопа и просматривают десять полей зрения при увеличении в 600 – 800 раз. При просмотре их не должно быть обнаружено ни посторонних дрожжевых грибов, ни бактерий.

Метод микрокультуры.

Для определения посторонних дрожжевых грибов применяют метод микрокультуры. Этот метод удобен для получения быстрого ответа о составе микрофлоры.

На дно чашки Петри кладут фильтровальную бумагу, вырезанную по форме чашки. Туда же помещают две стеклянные палочки, предметное и покровное стекло и все стерилизуют сухим жаром в течение 1 ч при 160°C. Стерильной стеклянной палочкой наносят на стерильное предметное стекло каплю исследуемого образца, к этой капле прибавляют 2 – 3 капли 1 %-ого

сусло-агара, предварительно расплавленного на водяной бане и охлажденного до 50 – 45°C. Смешивают агар с жидкостью уголком стерильного покровного стекла и накрывают им получившийся таким образом препарат. Фильтровальную бумагу в чашке Петри смачивают стерильной водой, препарат помещают в чашку Петри на стеклянные палочки и ставят в термостат при температуре 30°C.

Через 6 – 8 ч ведут наблюдение за формой выросших микроколоний под микроскопом. Просматривают 20 полей зрения в середине препарата и по краям. В каждом поле подсчитывают отдельно микроколонии как сахаромикетов, состоящие из круглых или овальных клеток, так и посторонних дрожжевых грибов, обычно очень резко выделяющихся по своему внешнему виду и форме клеток.

Определяют среднее количество колоний сахаромикетов и посторонних дрожжевых грибов и рассчитывают их процентное соотношение.

Посев на чашки Петри.

Пробу из культуры, предварительно разведенную в стерильной водопроводной воде, наносят на поверхность твердой питательной среды, инкубируют при оптимальных условиях и определяют наличие неспецифических колоний. На поверхности питательной среды в чашках Петри чистая культура образует однородные по морфологии, консистенции и пигментации колонии.

Посев на элективную питательную среду.

Степень засоренности чистой культуры, маточных и засеваемых дрожжей посторонними дрожжевыми и дрожжеподобными грибами оценивают при помощи элективной ацетатной среды, где имеются благоприятные условия для размножения диких дрожжей, а сахаромикеты не размножаются. Благодаря этому представляется возможным выявить в исследуемом материале даже единичные клетки диких дрожжевых грибов.

Исследуемый материал – 1 – 2 капли взвеси исследуемых дрожжей – вносят в пробирку с ацетатной средой. Посев производят с соблюдением всех правил асептики – над пламенем горелки, стерильной пипеткой или предварительно прокаленной петлей.

Засеянную пробирку помещают в термостат при температуре 30°C и ведут за ней ежедневные наблюдения. Появление пленки на поверхности среды или помутнение ее указывает на наличие в исследуемом материале посторонних дрожжевых грибов. Чем раньше появится пленка, тем более инфицированным является материал. Быстрота появления пленки позволяет дать оценку степени зараженности материала посторонними дрожжевыми грибами.

Если пленка появилась через 5 или большее число дней либо совсем не появилась, то это означает, что культура чистая, материал не содержит

посторонних дрожжей в значимых для производства количествах; если же пленка появилась через 3 – 4 дня, то дрожжи ЧК или ЕЧК удовлетворительные и пригодны для работы; если пленка появилась через 1 – 2 дня, то дрожжи ЧК и ЕЧК неудовлетворительные и не пригодны для работы.

По истечении сроков инкубации необходимо провести микроскопирование и пересев пробы на сусло-агар для анализа культуральных свойств.

Повседневный микробиологический контроль процесса выращивания хлебопекарных дрожжей.

Для контроля процесса в пробах культуральной среды из дрожжерастильных аппаратов под микроскопом при увеличении в 800 – 1000 раз выполняют следующие анализы:

1) подсчитывают число почкующихся клеток (в %). Их количество должно нарастать с 30 до 40 % в начале цикла и до 80 – 90 % к 5-му часу и постепенно спадать к концу цикла. В непрерывной культуре на стадии отбора число почкующихся клеток должно быть постоянным – 40 – 50 %;

2) определяют количество мертвых клеток (в %), окрашенных метиленовым синим. Их количество не должно превышать 1 – 2 в поле зрения. Повышенное содержание мертвых клеток, наличие мертвых или двойных почек свидетельствует о содержании в среде ингибиторов (нитритов, оксидов меди, серебра, ртути, кадмия) или о нарушениях технологического режима;

3) определяют размеры клеток и их физиологическое состояние. В нормальных условиях выращивания клетки должны быть однородными, содержание мелких клеток не должно превышать 20 – 25 %. Зернистость, большое число мелких клеток (35 – 50 %) при малом количестве почкующихся свидетельствует об отсутствии в среде ростовых или зольных веществ, а также о нарушениях режимов температуры, pH и аэрирования;

4) определяют микробиологическую чистоту культуральных сред. На всех стадиях производства маточных дрожжей ЧК и ЕЧК не должно быть ни бактериальной, ни дрожжевой инфекции, как в жидкости, так и в пене.

На стадии засевных дрожжей в конце цикла допускается наличие в пене 1 – 2 клеток несакхаромицетов и бактерий на 10 – 15 полей зрения. В товарных аппаратах в начале цикла могут встречаться единичные клетки посторонних дрожжей с нарастанием их количества до 10 – 15 % в конце цикла и в отборочных аппаратах. Бактерий не должно быть более 1 – 2 в поле зрения.

Обнаружив повышенное содержание мертвых и мелких клеток, зернистость и малое количество почкующихся, следует проверить соблюдение всех параметров технологии.

Обеззараживание дрожжей ЧК и ЕЧК перед засевом.

Обработка серной кислотой (кислотная баня).

В зависимости от интенсивности микробной обсемененности дрожжи выдерживают от 30 до 60 мин при кислотности от 30 до 70 см³ 0,1 Н раствора гидроксида натрия на 100 см³.

Если в культуре обнаружено интенсивное бактериальное обсеменение и нет возможности начать новый разводочный цикл, применяют жесткую кислотную обработку в течение 60 мин при кислотности 70. В этом случае дозу засева удваивают или утраивают, используя максимально сбалансированные среды, так как наряду с бактериями гибнут и ослабленные дрожжевые клетки.

Ниже приведен расход концентрированной серной кислоты для кислотной обработки на 10 дм³ разведенных дрожжей.

<i>Кислотность, см³ 0,1 н. раствора NaOH на 100 см³</i>	<i>Расход H₂SO₄, г (см³)</i>
30	150 (85)
50	250 (140)
70	340 (190)

Не следует чрезмерно увлекаться кислотной обработкой, так как она оказывает технологически значимое отрицательное влияние на ферментативную активность дрожжей.

Обработка молочной кислотой.

Прессованные засевные дрожжи разводят 1 : 1 водой, размешивают и добавляют 100 %-ную молочную кислоту в количестве 2 % к массе дрожжей, тщательно перемешивают, выдерживают 1 ч и передают в дрожжерастильный аппарат.

Если засевные дрожжи хранят в виде суспензии с концентрацией дрожжей 500 г/дм³, расход 100 %-ной молочной кислоты составляет 1 % к объему суспензии. При использовании 40 %-ной молочной кислоты ее расход соответственно увеличивается в 2,5 раза.

По сравнению с серной молочная кислота имеет ряд преимуществ: неагрессивна, работа с ней не требует специальных мер (с точки зрения техники безопасности), она благоприятно действует на физиологию дрожжей.

Обработка смесью молочной и борной кислот.

Их дозируют из расчета 2,5 см³ 40 %-ной молочной и 0,2 г борной на 1 кг дрожжей. Борную кислоту предварительно разводят в небольшом количестве воды. Суспензию с добавками тщательно перемешивают и выдерживают 1 ч.

Обработка фуразолидоном.

Препарат добавляют к суспензии засевных дрожжей в количестве 0,1 % к массе дрожжей, или 0,05 % к объему дрожжевой суспензии, перемешивают и выдерживают 1 ч.

Обработка перекисью водорода.

Перекись водорода добавляют к суспензии засевных дрожжей из расчета 2 % к массе дрожжей, или 1 % к объему дрожжевой суспензии (в расчете на 100 %-ную), перемешивают и выдерживают 1 ч.

Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.

К ним относят метод диффузии в агар и метод серийных разведений (на жидкой и плотной питательных средах).

Для посева используют суточные чистые культуры выделенных микроорганизмов. При отсутствии возможности получения чистой культуры можно использовать дрожжевую взвесь или производственный субстрат, содержащие всю микрофлору в исследуемом материале.

При исследовании материала, содержащего дрожжевые клетки в остывшие до 45 – 50°C питательные среды вносят нистатин и тщательно перемешивают.

Метод диффузии в агар (метод бумажных дисков).

Это наиболее простой в исполнении метод. Однако его нельзя считать количественным.

В качестве основы питательной среды целесообразно применять производственное агаризованное (2,5 %) сусло с содержанием 120 – 140 мг% аминного азота. Питательную среду разливают в чашки Петри слоем 4 – 5 мм. Перед посевом чашки со средой досушивают в термостате или в стерильном боксе.

Диски с антибиотиками (диаметр 5 – 6 мм) готовят из специальных сортов фильтровальной бумаги. Каждый диск содержит определенное количество антибиотика, которое указано на этикетке флакона. Во флакон насыпают силикагель, который впитывает влагу и служит индикатором: при

переувлажнении силикагель меняет окраску с синей на розовую. При изменении окраски силикагеля во флаконе диски для использования непригодны. Флаконы с дисками хранят при температуре 4 – 20°C.

0,5 см³ исследуемого материала наносят на агар и шпателем Дригальского тщательно распределяют по поверхности питательной среды до полного впитывания. Затем на поверхность среды стерильным пинцетом накладывают, плотно прижимая, диски с разными антибиотиками на расстоянии 2 – 2,5 см друг от друга и от края чашки. Чашки с дисками выдерживают в термостате при 37°C в течение 24 – 48 ч в положении вверх дном.

Антибиотик из диска диффундирует в агар, вызывая гибель чувствительных бактерий, формируя, таким образом, вокруг диска зону отсутствия роста. Ближе к диску концентрация антибиотика в агаре выше, по мере удаления от диска концентрация снижается. Следовательно, чем больше диаметр зоны задержки роста вокруг антибиотика, тем более чувствительна к нему исследуемая культура.

Диаметр зоны задержки (отсутствия) роста микроорганизмов измеряют с помощью линейки или миллиметровой бумаги с точностью до 1 мм. Отсутствие зоны задержки роста микроорганизмов вокруг диска указывает на устойчивость исследуемой культуры к данному антибиотику.

При зоне отсутствия роста до 10 мм культура считается устойчивой, от 10 до 15 мм говорят о малой чувствительности к антибиотику, от 15 до 25 мм – о достаточной чувствительности, свыше 25 мм – о высокой чувствительности.

Метод серийных разведений.

Для проведения опыта готовят основные растворы антибиотиков. Готовятся они с таким расчетом, чтобы в первой пробирке концентрация антибиотика составила 100 ЕД/см³.

На этикетке ампулы или флакона указана концентрация антибиотика в ЕД/см³ или мкг/см³. Навески бензилпенициллина калиевой или натриевой соли, ампициллина тригидрата, оксациллина натриевой соли, цефалотина, цефалексина растворяют в 1/15 М фосфатном буфере (калия фосфат однозамещенный – 3,63 г, натрия фосфат двузамещенный – 7,13 г, вода дистиллированная – до 1000 см³). Основные растворы тетрациклиновых антибиотиков готовят на 0,01 Н растворе соляной кислоты. Для приготовления основных растворов нео-, моно-, канамицина используют дистиллированную воду.

Если на этикетке препарата дозировка указана в весовых единицах, следует иметь в виду, что для большей части антибиотиков 1 г активного вещества соответствует 1 000 000 ЕД. Из этого расчета и следует разводить антибиотик.

Если порошок антибиотика расфасован не мерно и на этикетке указано количество единиц активности в 1 мг, необходимо к точной навеске

препарата, сделанной на аналитических весах, добавить равный объем растворителя, т. е. получить раствор мг/см³, в 1 см³ которого содержится столько единиц, сколько их было указано на этикетке. Из этого основного раствора делают дальнейшие разведения.

Для определения чувствительности микробов к сульфаниламидам может быть применен любой из указанных методов, причем во внимание принимается только степень разведения навески препарата.

Метод серийных разведений в жидкой питательной среде.

На основе стерильного производственного суслу готовится серия 2-кратных серийных разведений исследуемого антибиотика. Первая пробирка содержит 100 ЕД/см³ антибиотика, каждая последующая – в два раза меньше. Засевная доза исследуемой суточной бактериальной культуры составляет 10 % от общего объема питательной среды.

Питательную среду разливают по 4,5 см³ в пробирки, расставленные в штативы по 10 в каждом ряду. Готовят основной раствор антибиотика, и добавляют 4,5 см³ этого раствора в первую пробирку. После тщательного перемешивания новой стерильной мерной пипеткой переносят 4,5 см³ из этой пробирки в следующую и т. д. до девятой пробирки, из которой 4,5 см³ выливают. Десятая пробирка, не содержащая антибиотика, служит контролем роста культуры.

Для постановки этого опыта используют имеющиеся в продаже препараты, на этикетке которых указано количество единиц во флаконе. Например, если флакон содержит 500 000 ЕД пенициллина, то, добавив в него 10 см³ дистиллированной воды, получают раствор, содержащий в 1 см³ 50 000 ЕД, при дальнейшем разведении в 100 раз получают раствор с концентрацией пенициллина 500 ЕД/см³. Для получения требуемой концентрации антибиотика дальнейшие разведения целесообразнее делать с использованием стерильной питательной среды.

Чистые агаровые или бульонные культуры микроорганизмов предварительно разводят физиологическим раствором до концентрации клеток $5 \cdot 10^6$ клеток/см³ в соответствии со стандартом мутности.

Агаровую культуру испытуемого микроба смывают изотоническим раствором хлорида натрия. Полученную взвесь по 1,0 см³ вносят во все пробирки ряда, начиная с контрольной.

Результаты регистрируют после инкубации при 37°C в течение 24 – 48 часов. Последняя пробирка с прозрачным бульоном, при наличии густого роста в контроле, определяет минимальную, подавляющую рост данного микроорганизма концентрацию антибиотика.

Учет результатов: наименьшее количество антибиотика, дающее визуально полную задержку роста (среда прозрачная), соответствует минимальной подавляющей концентрации препарата (МПК или МБсК). Минимальную бактерицидную концентрацию (МБцК) определяют высевом на плотные питательные среды из последних прозрачных пробирок, которые

предварительно встряхивают. Наименьшее количество антибиотика в пробирке, содержимое которой после инкубирования в течение 24 – 72 ч не дало роста бактерий при высеве на питательную среду, принимают за МБцК.

Метод серийных разведений на плотной питательной среде.

Для определения чувствительности к антибиотикам большинства микроорганизмов используют МПА или 2,5 %-ный агар на основе производственного суслу с содержанием аминного азота 120 – 140 мг/см³. Приготовленный основной раствор антибиотиков разводят в плотной питательной среде. Для этого к расплавленному и охлажденному до 55°C агару, разлитому в широкие пробирки по 18 см³, добавляют по 2 см³ соответствующего разведения определенного антибиотика, тщательно перемешивают и переливают в стерильную чашку Петри. После застывания агара чашки Петри подсушивают в течение 1 ч. Контрольные чашки Петри с агаром не содержат антибиотика. Все чашки Петри делят на сектора, каждый из которых засевают исследуемой культурой. Посев делают бактериологической петлей из микробной суспензии с концентрацией клеток 10⁶ – 10⁷ клеток/см³. Чашки помещают в термостат при 37°C на 24 – 48 ч.

Наименьшую концентрацию антибиотика, при которой наблюдают полную задержку роста бактерий на агаре или рост единичных колоний, принимают за МПК препарата. В том случае, когда рост культуры отсутствует на всех чашках, кроме контрольной считают, что исследуемые концентрации антибиотиков превышают МПК препарата. Если на всех чашках отмечают рост культуры, это значит, что микроорганизм устойчив ко всем концентрациям антибиотика.

Общую чувствительность к сульфаниламидам, как и к антибиотикам, можно определить методом канавки. На агаре в чашке Петри по ее диаметру прорезают канавку, в которую вносят определенное разведение изучаемого препарата. Перпендикулярно к канавке засевают штрихом изучаемые культуры микроорганизмов. После инкубации при 37°C 24 – 48 ч отмечают наличие участков задержки роста микроорганизмов, если последние чувствительны к данному препарату.

Влажность прессованных и сухих дрожжей.

Арбитражный метод.

1,5 – 2,0 г исследуемых дрожжей взвешивают на аналитических весах в чистом высушенном и тарированном бюксе с притертой крышкой.

Прессованные дрожжи предварительно следует измельчить и протереть через сито с отверстиями диаметром 2 – 3 мм.

Высушивание проводят в сушильном шкафу при температуре 105°C до постоянной массы. Первое взвешивание производят через 4 ч после начала высушивания, последующие – через 1 ч. Постоянная масса считается

достигнутой, если разница между двумя взвешиваниями не превышает 0,001 г. Перед каждым взвешиванием бюкс охлаждают в эксикаторе.

Влажность x (в %) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{(a - b) \cdot 100}{a},$$

где

a – масса навески до высушивания, г.

b – масса навески после высушивания, г.

При вычислении результатов доли до 0,05 отбрасывают, а доли, равные 0,05 и более, округляют до 0,1.

Ускоренные методы.

Экспресс-метод.

Высушивание навески дрожжей около 5 г в бюксе с притертой крышкой производится в течение 1 часа при температуре 30°C и затем 50 минут при 130°C. Порядок взвешивания и расчетов такой же, как и в арбитражном методе.

Пленчатый способ.

Способ основан на предварительном разрушении вегетативной формы дрожжей, чтобы вместо удаления клеточной влаги использовать законы осмоса и диффузии и заставить клетку отдать свою внеклеточную, внутриклеточную и даже интрамицеллярную влагу в воду.

В предварительно высушенном и тарированном металлическом бюксе на технических весах взвешивают навеску дрожжей около 2 г. Затем в него наливают 5 – 7 см³ дистиллированной воды и тщательно размешивают стеклянной палочкой до равномерной суспензии. Оставшиеся на палочке дрожжи смывают 5 – 7 см³ воды в тот же бюкс.

Бюкс с содержимым нагревают до кипения, а затем покачивают тигельными щипцами для размешивания жидкости до исчезновения пены и образования на дне бюкса равномерной белой пленки.

Чтобы исключить подгорание пленки, бюкс ставят на асбестовую сетку. Процесс испарения влаги длится 5 – 7 мин. Как только образуется белая пленка, бюкс помещают в сушильный шкаф на 1 ч 20 мин для досушивания при температуре 105°C. Затем бюкс взвешивают и вычисляют содержание влаги в дрожжах, как указано выше.

Данный метод применим для определения содержания дрожжей в дрожжевом молоке, отпускаемом на хлебозаводы в качестве готовой продукции.

Для перевода сухого вещества на прессованные дрожжи влажностью 75 % полученный результат умножают на 4.

Высушивание в приборе ВНИИХП-ВЧ.

В основу конструкции прибора положен принцип прогрева обезвоживаемого материала тепловыми лучами, исходящими из темного нагретого тела. Быстрое обезвоживание материала осуществляется путем выпаривания влаги из вещества, прогреваемого непосредственно прилегающими к нему с обеих сторон массивными плитами из материала с высокой теплопроводностью и теплоемкостью. Плиты, излучающие тепло, в свою очередь нагревают электрическими нагревателями.

Прибор изготавливают прямоугольной или круглой формы. Он состоит из двух массивных металлических плит, скрепленных между собой шарнирами, с приспособлением для установки расстояния между плитами. С наружной стороны плит имеются плоские электронагреватели с двумя диапазонами нагрева. Электронагреватели помещены в металлические кожухи с асбестовой прокладкой.

Для измерения температуры греющих поверхностей в верхнем и нижнем блоке имеются специальные карманы для установки в них обычных химических термометров.

Прибор имеет два диапазона нагрева: сильный и слабый.

При сильном нагреве температура пластин за 20 – 25 минут достигает 160°C. Электронагреватели мощностью 400 – 500 Вт для каждой плиты включают только при начальном разогреве их. Прибор в это время должен находиться под постоянным наблюдением.

Для слабого нагрева применяют электронагреватель мощностью около 100 Вт для каждой пластины. Он служит для поддержания требуемой температуры при работе с прибором.

Плиты переключают с сильного нагрева на слабый при помощи переключателя. На нем указаны положения переключателя в позиции «сильный нагрев» и «слабый нагрев». Стабильность температуры во время определений обеспечивается за счет тепла, аккумулированного в пластинах. Колебания температуры пластин до и после высушивания анализируемого материала составляют около $\pm 3^{\circ}\text{C}$ в зависимости от содержания в нем влаги. Расхождение в температуре верхней и нижней пластин при рабочем состоянии прибора не должно превышать 5°C.

Для более точной регулировки нагрева пластин и поддержания стабильности температуры прибора рекомендуется подключить реостат.

Перед началом работы специальным приспособлением должно быть отрегулировано расстояние между нагревательными плитами: оно не должно превышать 2 мм и должно быть постоянным.

Нагревательные поверхности плит перед началом работы осматривают и в случае необходимости протирают сухой или влажной тряпкой.

Для определения влажности включают прибор и нагревают его до температуры 160°C. Из листа непроклеенной (газетной или ротаторной) бумаги размером 20×15 см готовят пакет, складывая его вдвое, загибая края.

Два таких пакета кладут рядом на плиту прибора (так, чтобы они не касались), накрывают второй плитой, следя за тем, чтобы зазор между плитами был всюду одинаковым, и сушат в течение 3 мин при 160°C. Затем пакеты помещают в эксикатор на 2 – 3 мин для охлаждения. После этого их взвешивают на технических весах с точностью до 0,01 г и на краю пакета записывают его вес.

Пробу прессованных дрожжей, отобранную для анализа, протирают через сетку с отверстиями диаметром 2 – 3 мм, быстро отбирают в пакет около 5 г дрожжей, закрывают его и взвешивают. Вес записывают на краю пакета. Точно также берут и вторую навеску дрожжей.

Дрожжи в пакете осторожно встряхивают, чтобы они распределились равномерно по всей внутренней поверхности пакета. Если дрожжи влажные и легко склеиваются в комочки, то навеску надо распределить по пакету шпателем, после чего взвесить его.

При анализе сухих дрожжей берут навеску около 4 г.

Пакеты с дрожжами высушивают при температуре 160 – 162°C в течение 7 мин. После этого пакеты помещают на 2 – 3 мин в эксикатор для охлаждения, затем взвешивают на технических весах с точностью до 0,01 г и записывают вес на том же пакете.

Влажность дрожжей в процентах (x) вычисляют по следующей формуле:

$$x = \frac{(a - в) \cdot 100}{(a - б)},$$

где

a – вес пакета вместе с навеской дрожжей до сушки;

$б$ – вес пустого пакета;

$в$ – вес пакета с дрожжами после сушки.

Кислотность дрожжей.

Арбитражный метод.

Навеску дрожжей в 10 г, взятую на технических весах, растирают в фарфоровой чашке или стакане с 50 см³ дистиллированной воды и титруют 0,1 Н раствором NaOH в присутствии индикатора фенолфталеина до появления розового окрашивания. Кислотность дрожжей x в пересчете на уксусную кислоту (в мг на 100 г дрожжей) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{a \cdot б \cdot 100}{10},$$

где

a – количество 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на нейтрализацию, см³;

b – количество уксусной кислоты, соответствующее 1 см³ 0,1 Н раствора щелочи, мг.

При вычислении результатов анализа доли до 0,5 отбрасывают, а доли, равные 0,5 и более, округляют до единицы.

Кислотность нормальных дрожжей обычно находится в пределах 1 – 2 мл нормального раствора едкого натра, что соответствует 60 – 120 мг уксусной кислоты на 100 г прессованных дрожжей.

Метод электротитрования.

В мерном цилиндре готовят 25 см³ нейтральной дистиллированной воды. Навеску прессованных дрожжей 5 г помещают в стакан с 15 – 20 см³ воды.

Полученную суспензию переносят без потерь в чашку рН-метра, ополаскивая стакан оставшейся в цилиндре водой.

Раствор титруют при интенсивном помешивании до рН 8,8. Допускается отклонение $\pm 0,2$. Процесс титрования должен длиться не более 1 мин.

Расчет ведут изложенным выше способом, ставя в знаменатель навеску 5 г.

Химический состав биомассы дрожжей.

Определение общего азота в прессованных дрожжах.

В товарных дрожжах обычно содержится 1,65 – 1,8 % азота, в засевных – 2,0 – 2,2 %, а в маточных – 2,2 – 2,4 % азота.

Анализу подвергают пробы на любом этапе технологического процесса от каждого затора или от каждой партии дрожжей.

Общий азот в прессованных дрожжах определяют по методу Кьельдаля.

Около 4 г прессованных дрожжей отвешивают в бюксе на аналитических весах с точностью до четвертого знака и переносят в колбу Кьельдаля. Остаток дрожжей в бюксе взвешивают и по разности определяют вес взятой навески. В колбу наливают 20 см³ концентрированной серной кислоты «ХЧ», помещают 2 – 3 крупинки селена или около 1 г сернокислой меди и около 10 г сернокислого калия. Если в дальнейшем в этой же навеске дрожжей определяют и фосфор, сжигание с медью производить нельзя. Содержимое колбы осторожно смешивают, слегка вращая колбу, и закрывают ее специальной стеклянной пробкой с расширением, неплотно вставляющейся в горло колбы.

Затем колбу ставят в наклонном положении в вытяжной шкаф на нагревательный прибор (плитку или газовую горелку). Сначала сжигание ведут при слабом нагревании, при этом происходит обугливание и выделение

сернистого газа, затем, когда выделение газа станет более равномерным, нагревание усиливают. Когда жидкость перестанет пениться, обуглившиеся, но несгоревшие комочки вещества, приставшие к стенкам, осторожным помешиванием смывают в жидкость, которая постепенно становится совершенно прозрачной. Прозрачную жидкость нагревают еще 1 – 2 ч.

После сжигания содержимое колбы Кьельдаля смешивают с небольшим количеством воды и переливают в мерную колбу емкостью 250 см³, споласкивают колбу Кьельдаля еще 2 – 3 раза и промывную воду сливают в ту же мерную колбу. Затем содержимое ее доводят водой до метки, хорошо перемешивают и переводят в колбу для отгона аммиака.

Перегонку производят или в специальном приборе, где можно одновременно проводить несколько определений, или в аппарате (Рис. 39), который собирают следующим образом: круглодонную или плоскодонную колбу емкостью 1 л устанавливают на штатив, соединяют ее плотной резиновой пробкой с каплеуловителем, а затем с холодильником. В пробку, кроме трубки каплеуловителя, вставляют стеклянную трубку, соединенную каучуковой трубкой с небольшой воронкой диаметром 4 – 5 см; на каучуковой трубке имеется винтовой зажим.



Рис. 39. *Прибор для определения азота по Кьельдалю.*

К другому концу холодильника присоединяют стеклянную трубку с шарообразным расширением в верхней части, которую опускают почти до дна приемника. Приемником может служить обычная коническая колба емкостью 500 см³. Все части прибора должны быть плотно пригнаны. В приемник наливают 50 см³ 0,1N раствора серной кислоты и 1 – 2 капли раствора метилрот и устанавливают его так, чтобы конец трубки с шарообразным расширением был погружен в кислоту.

Содержимое колбы Кьельдаля после охлаждения разбавляют дистиллированной водой небольшими порциями и сливают через воронку в колбу для отгонки. Колбу Кьельдаля ополаскивают несколько раз водой с таким расчетом, чтобы общий объем жидкости составлял около 400 –

500 см³. Колбу помещают на штатив и собирают аппарат, как было указано выше. Затем открывают винтовой зажим воронки и наливают 50 – 100 см³ 33 %-ого раствора едкой щелочи. Воронку смывают небольшим количеством дистиллированной воды, завинчивают зажим и содержимое колбы взбалтывают. Наличие в колбе для отгонки избытка щелочи устанавливают при помощи кусочка лакмусовой бумажки, брошенной в колбу. Лакмусовая бумажка синее.

Колбу для отгонки подогревают горелкой и отгоняют аммиак с водяными парами до тех пор, пока капля отгона не перестанет вызывать посинения красной лакмусовой бумажки. Для этого достаточно отогнать из колбы около половины всей жидкости.

По окончании отгонки конец трубки, опущенный в кислоту, споласкивают водой в приемник и содержимое приемника титруют 0,1 Н раствором щелочи. Затем определяют количество миллилитров 0,1 Н раствора едкого натра, израсходованного на титрование серной кислоты, не связанной аммиаком, после чего производят расчет. Количество связанной кислоты соответствует выделившемуся аммиаку. 1 см³ 0,1 Н щелочи соответствует 1,40 мг азота.

Если параллельно с определением азота производят определение фосфора, то из мерной колбы сначала отбирают 50 мл для этого определения, а остальной раствор переводят в колбу для отгона аммиака.

Содержание азота (*N*) в процентах вычисляют по следующей формуле:

$$N = \frac{0,0014 (a - b) 100}{p},$$

где

a – количество 0,1 Н раствора серной кислоты, налитой в приемник, в см³
(1 см³ 0,1 Н раствора серной кислоты соответствует 0,0014 г азота);
b – количество 0,1 Н раствора щелочи, затраченное на титрование, в см³;
p – навеска дрожжей в г.

Общее количество белковых веществ вычисляют путем умножения количества общего азота на коэффициент 6,25.

Пример.

Для анализа взято 4,8200 г дрожжей. Для определения фосфора отобрана 1/5 часть, что составляет 4,82 : 5 = 0,964 г; для определения азота взято 4,8200 – 0,964 = 3,8560 г. В приемник налито 75 см³ 0,1 Н серной кислоты, на титрование оставшейся свободной кислоты затрачено 22,4 см³ 0,1 Н раствора едкого натра. Аммиаком связано 75 – 22,4 = 52,6 см³ кислоты. Следовательно, содержание азота в дрожжах составит:

$$N = \frac{0,0014 \cdot 52,6 \cdot 100}{3,8560} = 1,9 \%$$

Определение фосфорного ангидрида в дрожжах.

В прессованных дрожжах содержится от 0,7 до 1,4 % P_2O_5 . Содержание фосфорного ангидрида в дрожжах определяют колориметрическим методом Бриггса или при помощи фотоэлектроколориметра.

Метод Бриггса.

Визуальный метод.

Принцип метода основан на образовании фосфорномолибденовой кислоты и ее восстановлении гидрохиноном и Na_2SO_3 с образованием устойчивой синей окраски. Интенсивность окраски возрастает пропорционально количеству неорганического фосфора в испытуемой пробе.

Навеску прессованных дрожжей около 1 г помещают в колбу Кьельдаля и сжигают ее так же, как при определении общего азота. После сжигания содержимое колбы переводят в мерную колбу емкостью 100 $см^3$. Колбу Кьельдаля несколько раз ополаскивают водой, которую также сливают в мерную колбу, затем содержимое колбы доводят водой приблизительно до 50 $см^3$, нейтрализуют 33 %-ным раствором едкого натра и доливают водой до метки, т. е. до объема 100 $см^3$, и хорошо перемешивают. Из приготовленного таким образом раствора отбирают 1 $см^3$ в пробирку высотой 70 мм и диаметром 15 мм. Одновременно в семи других пробирках такого же размера готовят стандартный ряд с определенными, все увеличивающимися концентрациями фосфора: 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,07 мг фосфора в 1 $см^3$.

В первую из семи пробирок наливают 0,1 $см^3$ стандартного раствора KH_2PO_4 , что соответствует 0,01 мг фосфора; во вторую – 0,2 $см^3$, т. е. 0,02 мг фосфора; в третью – 0,3; в четвертую – 0,4; в пятую – 0,5; в шестую – 0,6; в седьмую – 0,7 $см^3$. Затем в первую пробирку доливают 0,9 $см^3$ воды, во вторую – 0,8, в третью – 0,7, в четвертую – 0,6, в пятую – 0,5, в шестую – 0,4, в седьмую – 0,3. Таким образом, в каждой из семи пробирок объем жидкости равняется 1 $см^3$.

Затем в каждую из восьми пробирок наливают по 1 $см^3$ молибденового раствора, по 1 $см^3$ раствора гидрохинона и по 1 $см^3$ раствора безводного сульфита. После взбалтывания содержимое пробирок окрашивается в различные по интенсивности оттенки синего цвета – от светло-синего до темно-синего. Пробирки оставляют стоять 20 мин, после чего сравнивают окраску пробирки с испытуемой жидкостью с окраской каждой из семи пробирок, содержащих стандартный раствор. Содержание фосфора в анализируемых дрожжах рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{a \cdot b \cdot 100 \cdot 2,29}{B \cdot 1000},$$

где

- A* – содержание P_2O_5 в прессованных дрожжах в %;
- A* – содержание фосфора в пробирке с испытуемым веществом (по стандартному ряду);
- б* – разведение;
- В* – навеска вещества (в пересчете на 75% влаги);
- 2,29** – коэффициент перевода *P* в P_2O_5 (частное от деления молекулярного веса P_2O_5 на молекулярный вес фосфора – $142 : 62 = 2,29$);
- 100** – пересчет на проценты;
- 1000** – перевод мг в г.

Пример.

Цвет пробирки с испытуемым раствором соответствует цвету пробирки стандартного ряда, содержащей 0,04 мг фосфора. Подставляем наши данные в формулу и производим расчет содержания P_2O_5 в прессованных дрожжах

$$A = \frac{0,04 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 2,29}{1,0 \cdot 1000} = 0,91.$$

Растворы для определения фосфора по методу Бриггса.

1. **5 %-ный молибденовый раствор.** 25 г молибденовокислого аммония растворяют в 300 см³ дистиллированной воды, к полученному раствору добавляют 75 см³ концентрированной серной кислоты, разбавленной 120 см³ воды; общий объем раствора доводят водой до объема 500 см³.
2. **Свежеприготовленный 1 %-ный раствор гидрохинона.** К 100 см³ раствора добавляют каплю концентрированной серной кислоты для предотвращения окисления.
3. **20 %-ный раствор безводного сульфита (Na_2SO_3).** Вследствие окисления сульфитный раствор портится при долгом хранении, поэтому пользуются свежеприготовленным раствором.
4. **Стандартный раствор кислого фосфорнокислого калия.** Готовят из чистой соли KH_2PO_4 , которую предварительно измельчают и высушивают в эксикаторе в течение нескольких дней. 4,394 г соли растворяют в дистиллированной воде (1 дм³) и добавляют несколько капель хлороформа как антисептика. 1 см³ раствора содержит 1 мг фосфора. 100 см³ этого раствора разбавляют водой до 1 дм³ и получают раствор, в 1 см³ которого содержится 0,1 мг фосфора.

Фотозлектроколориметрический метод.

В модельных растворах стандартного ряда пробирок определяют оптическую плотность с помощью прибора ФЭК и строят калибровочный график. На оси абсцисс откладывают количество фосфора, а на оси ординат – оптическую плотность. Для данной шкалы стандартного ряда пробирок график будет постоянным.

Определив на приборе ФЭК оптическую плотность пробирки с испытуемым раствором, по графику находят соответствующее ей содержание фосфора в пробирке.

Определение содержания золы.

В прессованных дрожжах содержание золы обычно колеблется от 1,6 до 2 %. В пересчете на прессованные дрожжи с содержанием 75 % влаги оно не должно быть выше 2,5 %, а на сухое вещество дрожжей – не более 10 %.

Около 2 г прессованных дрожжей отвешивают на аналитических весах с точностью до четвертого знака в предварительно прокаленном платиновом или фарфоровом тигле. Навеску предварительно подсушивают при температуре 70 – 80°C; когда консистенция дрожжей станет такой, что можно не опасаться разбрызгивания, добавляют 8 – 10 капель серной кислоты удельным весом 1,84, размешивают оплавленной стеклянной палочкой, вытирают палочку маленьким кусочком фильтровальной бумаги, который также бросают в чашку и, держа чашку щипцами, осторожно нагревают на небольшом пламени горелки под тягой. Когда масса перестанет пениться и выделение паров и газов прекратится, ее окончательно сжигают и прокаливают до постоянного веса в муфеле при слабом калении или на горелке, при этом доводят платиновую чашку или тигель до слабо-красного каления.

Сжигание навески 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.

Полученный вес сернокислой золы для перевода на условную углекислую золу умножают на коэффициент 0,9 и пересчитывают на 100 г дрожжей.

Пример.

Вес (в г) равен:

тигля с навеской дрожжей	18,3100
тигля прокаленного пустого	15,5421
навески дрожжей	2,7683
тигля с золой	15,7436
золы	0,2015

Вес углекислой золы (в г) составит $0,2015 \cdot 0,9 = 0,18135$

$$\text{Содержание золы (в \%)} \text{ равно } \frac{0,18135 \cdot 100}{2,7683} = 6,55$$

Определение содержания глутатиона.

Метод основан на том, что в кислой среде в присутствии йодистого калия восстановленная форма глутатиона под действием KJO_3 переходит в окисленную.

Глутатион в восстановленной форме содержит сульфгидрильную группу (SH) и является активатором протеолиза; в сахаромикетах его 0,6 – 0,8, что в 4 – 5 раз больше, чем в несакхаромикетах – 0,15 – 0,1. Поэтому содержание глутатиона может служить относительным показателем степени загрязненности прессованных дрожжей посторонними дрожжевыми грибами. Но, что не менее важно, метод может быть использован, как косвенный показатель функциональной полноценности клеточной стенки.

Определение глутатиона – йодредуцирующих веществ – производят с помощью йодноватокислого калия и выражают в мл 0,001Н раствора KJO_3 , пошедшего на титрование 1 г прессованных дрожжей.

Ход определения.

10 г исследуемых дрожжей помещают в колбу, постепенно приливают 95 см³ дистиллированной воды и размешивают; через 5 мин добавляют 5 см³ молярного раствора сульфосалициловой кислоты (25 г на 100 см³ дистиллированной воды). Смесь тщательно встряхивают, фильтруют через сухой обеззоленный фильтр и из фильтрата берут 10 см³ в небольшую колбу. В ту же колбу добавляют 2,5 см³ 4 %-ой сульфосалициловой кислоты, 2,5 см³ 5 %-ого раствора химически чистого КJ (приготавливаемого ежедневно и проверенного на отсутствие следов йода), 10 капель 1 %-ого раствора крахмала (в воде или лучше в насыщенном растворе KCl или NaCl), осторожно оттитровывают из микробюретки 0,001 Н раствором KJO_3 до первого изменения окраски.

Титрование производят при температуре растворов, не превышающей 20°C. Таким же путем ставят и контрольное определение, заменяя только испытуемый раствор 10 см³ дистиллированной воды и вычитая полученные цифры из результатов основного опыта. Полученные результаты выражают в см³ 0,001 Н KJO_3 на 1 г прессованных дрожжей.

Общий запас восстановленного глутатиона определяют после 5-минутного кипячения дрожжей с водой с применением той же методики.

Растворы для определения глутатиона.

1. **Молярный раствор сульфосалициловой кислоты.** 25 г на 100 см³ дистиллированной воды.
2. **4 %-ный раствор сульфосалициловой кислоты.** 18 см³ молярного раствора разбавляют до 100 см³ дистиллированной водой.
3. **0,001 Н раствор йодноватокислого калия.** 0,1783 г перекристаллизованного химически чистого KJO_3 растворяют в мерной колбе на 1 дм³, откуда берут 20 см³ раствора, прибавляют 9 см³ молярного раствора сульфосалициловой кислоты и доводят дистиллированной водой до 100 см³ в мерной колбе. Этот разбавленный раствор KJO_3

следует готовить каждую пятидневку и хранить при пониженной температуре. 8,5 г KJO_3 растворяют в 100 см³ дистиллированной воды, содержимое фильтруют. Для кристаллизации соли фильтрат помещают в холодильник на ночь, осадок отфильтровывают и высушивают между листами фильтровальной бумаги. Полученную соль хранят в темной стеклянной банке с притертой пробкой.

Стойкость при хранении.

Стойкость прессованных дрожжей.

Определение стойкости дрожжей при температуре от 0 до + 4°C.

От каждой партии дрожжей одной даты выработки берут бруски, соответствующие массе единицы фасовки данной партии, укладывают в применяемую для отправки тару и помещают в холодильную камеру, в которой поддерживают температуру от 0 до 4°C. На этикетке бруска дрожжей отмечают час и дату начала хранения. За пробой ведут наблюдение 12 суток, в течение этого срока ежедневно отмечают в журнале органолептические показатели дрожжей. Через 12 суток определяют кислотность дрожжей, результаты анализа записывают в лабораторном журнале.

Определение стойкости дрожжей в термостате при 35°C (ускоренный метод).

Завернутый в бумагу брусок дрожжей, предварительно охлажденный до 6°C, массой 0,5 или 1 кг помещают в термостат при температуре 35°C и хранят до размягчения. Время (в часах), прошедшее от момента помещения дрожжей в термостат до размягчения, характеризует их стойкость.

Стойкими считают дрожжи, выдерживающие не менее 72 ч.

Шведский метод.

Заключается в определении стойкости дрожжей по изменению подъемной силы.

Берут две навески по 5 г из одного бруска дрожжей и помещают в маленькие тигли. Один из тиглей ставят в термостат на 24 ч при 35°C (необходимо точное соблюдение температуры и длительности хранения), другой – в холодильную камеру (контроль).

По истечении этого срока дрожжи вынимают из тиглей и определяют подъемную силу. Показатели термостатной пробы сравнивают с контрольной.

Для дрожжей с хорошей стойкостью ухудшение, подъемной силы от пребывания в неблагоприятных температурных условиях не должно превышать 20 мин.

Стойкость сушеных дрожжей.

На технических весах берут навеску 0,5 г сушеных дрожжей, помещают ее в колбу Эрленмейера на 250 см³, доливают 100 см³ дистиллированной воды, и оставляют в покое на 30 мин при комнатной температуре. Далее содержимое колбы взбалтывают и титруют 0,1 Н раствором NaOH в присутствии индикатора фенолфталеина до слаборозового окрашивания. Затем туда же добавляют 5 см³ 40 %-ого нейтрального формалина и вновь титруют щелочью до слаборозового окрашивания.

Общее количество 0,1 Н раствора гидроксида натрия, затраченное на оба титрования, является величиной показателя «сумма кислот», вымытых из клеток в силу увеличения проницаемости клеточных оболочек во время высушивания.

Таблица 22

Зависимость между содержанием в дрожжах трегалозы, суммой кислот и стойкостью сушеных дрожжей при хранении

<i>Длительность хранения дрожжей, мес.</i>	<i>Сумма кислот, мл 0,1 Н NaOH</i>	<i>Содержание трегалозы, % СВ</i>
Более 12	До 1,1	Более 16
6 – 12	1,1 – 1,3	14,1 – 16,0
4 – 5	1,4 – 1,5	12,1 – 14,0
Не более 3	1,6 – 1,7	11,1 – 12,0
Хранению не подлежат	Более 1,7	До 11,0

Технологические требования.

Основные требования к хлебопекарным дрожжам.

Каждая из используемых в дрожжевом и хлебопекарном производстве рас в различной степени должна отвечать следующим требованиям:

1. Высокая удельная скорость роста, определяющая их генеративную активность;
2. Устойчивость к мелассовым средам;
3. Кислотоустойчивые – в производстве ржанных и ржано-пшеничных сортов хлеба;
4. Стойкость к неблагоприятным факторам при хранении и обработке;
5. Стойкость к инфекции;
6. Способность синтезировать в достаточном количестве и с высокой ферментативной активностью зимазу (β-фруктофуранозидазу) и мальтазу

(α -глюкозидазу), что определяет их технологический показатель – зимазную и мальтазную активность;

7. Пылевидность;
8. Клетки крупные, диаметром 6 – 9 мкм;
9. Высокая подъемная сила;
10. Стабильность свойств и морфофункциональных характеристик в течение 10 – 15 генераций;
11. Высокая стойкость при хранении;
12. Устойчивость к высушиванию;
13. Способность обеспечить хороший вкус и аромат хлеба, для чего важны некоторые особенности метаболизма.

Основные требования к спиртовым дрожжам.***

Интенсификация процесса производства спирта требует использования рас дрожжей в различной степени соответствующих следующим требованиям:

1. Высокая бродильная активность и быстрое сбраживание сахаров сусла. Особенно ценно быстрое забраживание.
2. Высокая удельная скорость роста, определяющая их генеративную активность;
3. Предпочтительны штаммы с малыми и средними размерами клеток, что при равной норме введения обеспечит большую клеточную поверхность;
4. Пылевидность – для возможно большего контакта дрожжей со средой;
5. Стабильность свойств и морфофункциональных характеристик в течение 10 – 15 генераций;
6. Осмоустойчивые расы – активные в высокоплотных суслах с минимальным образованием побочных продуктов;
7. Расы с высокой спиртоустойчивостью и спиртообразующей способностью – активные при высоком содержании сахаров и обеспечивающие полное выбраживание сусла;
8. Кислотоустойчивые – сбраживающие сусло при высокой кислотности;
9. Термоустойчивые расы – активные при высокой температуре окружающего воздуха и сусла (выше 30°C) с минимальным образованием побочных продуктов;
10. Стойкость к неблагоприятным факторам при хранении и обработке;
11. Стойкость к инфекции;
12. Способность обеспечить хороший вкус и аромат спирта, для чего важны некоторые особенности метаболизма.

Основные требования к дрожжам виноделия.

Чистые культуры дрожжей должны быть конкурентоспособными, отличаться высокой скоростью размножения и скоростью сбраживания

сусла, сульфитостойкостью, термо- и холодостойкостью, кислотоустойчивостью, скоростью осветления вина в связи с образованием пылевидных или хлопьевидных (конгломератных) осадков. Различаются они по спиртообразующей способности, определяемой по количеству образованного спирта при сбраживании сусла с повышенным содержанием сахара, и по спиртоустойчивости, т.е. по способности размножаться в винах с разной спиртуозностью, и по фенотипическому признаку – киллер, нейтральный, чувствительный.

Свойства рас дрожжей при отборе конкурентоспособных культур для различных условий виноделия:

1. Сульфитостойкие расы для сбраживания сусла с повышенным содержанием диоксида серы (SO_2 свободный более 20 мг/дм^3);
2. Холодостойкие расы активные при низкой температуре сусла и окружающего воздуха (ниже 15°C);
3. Термоустойчивые расы активные при высокой температуре окружающего воздуха и сусла (выше 30°C);
4. Кислотоустойчивые – сбраживающие сусло при высокой кислотности (величина pH сусла ниже 3,0);
5. Расы с высокой спиртообразующей способностью – при высоком содержании сахаров сусла (свыше 22 %) и необходимости полного выбраживания;
6. Спиртоустойчивые – для возобновления брожения вина, при недобродах сусла;
7. Расы с пылевидной структурой осадка – при необходимости возможно большего контакта дрожжей со средой, при остановке брожения;
8. Расы с хлопьевидной структурой осадка (конгломератные расы) – для крепленых виноматериалов, с целью быстрого осветления виноматериалов, для шампанизации вин.

Основные требования к пивным дрожжам.

Подходящий штамм дрожжей, пригодный для приготовления пива может быть выбран при условии, что он обладает следующими свойствами:

1. Высокая бродильная активность и быстрое сбраживание сахаров сусла. Особенно ценно быстрое забраживание. Вместе с тем, в сусле должна остаться часть несброженных сахаров мальтозной группы для использования на стадии дображивания;
2. Высокая флокуляционная способность – медленное и полное оседание для осветления молодого пива в конце главного брожения и готового – в конце дображивания. Быстрооседающие дрожжи непригодны для дображивания, т.к. для использования остаточного экстракта и редукции диацетила дрожжи должны находиться во взвешенном состоянии;
3. Умеренная генеративная активность для обеспечения не более трехкратного прироста биомассы;
4. Стойкость к неблагоприятным факторам при хранении и обработке;

5. Стойкость к инфекции;
6. Стабильность свойств и морфофункциональных характеристик в течение 10 – 12 генераций;
7. Предпочтительны штаммы с малыми и средними размерами клеток, что при равной норме введения обеспечит большую клеточную поверхность;
8. Способность обеспечить хороший вкус и аромат (букет) пива, для чего важны некоторые особенности метаболизма: умеренное образование высших спиртов, низкий уровень образования дикетонов (в частности диацетила), незначительное образование летучих сернистых соединений, незначительное снижение в пиве горьких веществ хмеля, достаточное насыщение пива углекислотой.

Список использованной литературы.

1. Бурьян Н.И. Практическая микробиология виноделия. – Симферополь: Таврида, 2003.
2. Жвирблянская А.Ю., Исаева В.С. Дрожжи в пивоварении. – М.: Пищевая промышленность, 1979.
3. Качмазов Г.С., Сатцаева И.К., Галуев А.Э. Метод определения мальтазной и зимазной активности в модификации лаборатории микробиологии Северо-Осетинского Государственного Университета // Технологии живых систем / Вестник СКО АТН РФ Ставрополь: Северо-Кавказский Технический Университет. 2001. С. 108 – 109.
4. Качмазов Г.С., Сатцаева И.К. Метод лаборатории микробиологии СОГУ по определению газообразующей способности муки // Технологии живых систем / Вестник СКО АТН РФ Ставрополь: Северо-Кавказский Технический Университет. 2001. С. 110 – 112.
5. Качмазов Г.С., Сатцаева И.К., Галуев А.Э., Абаева З.З. Манометрический метод определения бродильной активности дрожжей лаборатории микробиологии СОГУ // Технологии живых систем / Вестник СКО АТН РФ Ставрополь: Северо-Кавказский Технический Университет. 2001. С. 112 – 113.
6. Качмазов Г.С., Сатцаева И.К., Дзампаева З.Т. Метод отбора наиболее активной культуры дрожжей // Производство спирта и ликероводочных изделий. 2004. № 1. С. 28.
7. Качмазов Г.С., Сатцаева И.К., Дзампаева З.Т. Метод определения осмотической устойчивости дрожжей // Производство спирта и ликероводочных изделий. 2004. № 2. С. 29.
8. Качмазов Г.С., Сатцаева И.К., Гуляева Е.В., Дзампаева З.Т. Выбор наиболее активной культуры дрожжей новым манометрическим методом // Производство спирта и ликероводочных изделий. 2004. № 2. С. 39.
9. Качмазов Г.С., Сатцаева И.К., Дзампаева З.Т. Сравнительная характеристика ферментативной активности дрожжей спиртовых рас // Производство спирта и ликероводочных изделий. 2004. № 4. С. 34.
10. Качмазов Г.С., Качмазова Г.С., Гугкаев С.Ю., Хаметова К.О. Сравнительная характеристика осмотической устойчивости дрожжей спиртовых рас // Производство спирта и ликероводочных изделий. 2007. № 3. С. 31.
11. Качмазов Г.С., Хаметова К.О., Хугаева К.Ч., Гелашвили Р.Ц. Новый метод определения спиртоустойчивости дрожжей // Производство спирта и ликероводочных изделий. 2007. № 4. С. 30.
12. Качмазов Г.С. «Автолизное число» – критерий оценки технологической устойчивости культуры // Производство спирта и ликероводочных изделий. 2008, № 4. С. 20 – 21.

13. Качмазов Г.С., Цагараева Е.Ф. Эксплуатация сухих дрожжей с учетом их морфофункциональной дефектности // Производство спирта и ликероводочных изделий. 2009, № 4, С. 9-11.
14. Методы выделения и идентификации дрожжей: Справочное пособие / И.П. Бабьева, В.И. Голубев. – М.: Пищевая промышленность, 1979.
15. Микробиология пива / Прист Ф.Дж., Й. Кемпбел (ред.); пер. с англ. – СПб.: Профессия, 2005.
16. Микробиология: Практикум / Л.Г. Бранцевич, Л.Н. Лысенко, В.В. Овод, А.В. Гурбик. – К.: Вища шк. Головное изд-во, 1987.
17. Микробиологический и химико-технологический контроль дрожжевого производства / Е.А. Плевако, О.А. Бакушинская. – М.: Пищевая промышленность, 1964.
18. Патент № 2229126. Рег. 20.05.2004.
19. Практикум по микробиологии: Учебное пособие / Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1976.
20. Практикум по микробиологии: Учебное пособие для студентов высших учебных заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.; Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005.
21. Руководство к практическим занятиям по микробиологии: Учебное пособие для студентов биологических специальностей пед. ин-тов / В.В. Аникеев, К.А. Лукомская. – М.: «Просвещение», 1977.
22. Саришвили Н.Г., Рейтблат Б.Б. Микробиологические основы технологии шампанизации вина. – М.: Пищевая промышленность, 2000.
23. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / Под ред. М.О. Биргера. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 1982.
24. Справочник по производству хлебопекарных дрожжей / С.С. Новаковская, Ю.И. Шишацкий. – М.: Пищевая промышленность, 1980.
25. Справочник работника лаборатории пивоваренного предприятия / Г.А. Ермолаева. – СПб.: Профессия, 2004.
26. Теория и практика виноделия. Т. 2. Характеристика вин. Созревание винограда. Дрожжи и бактерии / Рибера-Гайон Ж., Пейно Э., Рибера-Гайон П., Сюдро П.; пер. с франц., – М.: Пищевая промышленность, 1979.
27. Технология спирта / В.Л. Яровенко, В.А. Маринченко, В.А. Смирнов и др.; Под ред. проф. В.Л. Яровенко. – М.: Колос, 1999.
28. Химико-технологический контроль пиво-безалкогольного производства / Р.А. Колчева, Л.А. Херсонова, К.А. Калунянц, А.И. Сагова. – М.: Агропромиздат, 1988.

Геннадий Созырович Качмазов
кандидат ветеринарных наук,
доцент кафедры «Технология пищевых производств»
Северо-Осетинского государственного университета им. К.Л. Хетагурова.

Дрожжи
бродильных производств
Методы
Практическое руководство

Рецензенты:

С.И. Хорунжина – профессор кафедры «Технология бродильных производств и консервирования», доктор технических наук (Кемеровский технологический институт пищевой промышленности).

И.А. Еремина – доцент кафедры «Технология бродильных производств и консервирования», кандидат технических наук (Кемеровский технологический институт пищевой промышленности).

Л.В. Пермякова – доцент кафедры «Технология бродильных производств и консервирования», кандидат технических наук (Кемеровский технологический институт пищевой промышленности).

Рекомендовано к печати кафедрой «Технология пищевых продуктов»
Северо-Осетинского государственного университета им. К.Л. Хетагурова.

В авторской редакции.

Бумага типографская.

Печать принтерная.

Страниц 172, таблиц 22, рисунков 39, библиография 28 назв.

Владикавказ, 2010

Геннадий Созырович КАЧМАЗОВ
ДРОЖЖИ
БРОДИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДСТВ
ПРАКТИЧЕСКОЕ РУКОВОДСТВО
Учебное пособие

Зав. редакцией литературы
технологического пищевого профиля *И. О. Туренко*
Художественный редактор *С. Ю. Малахов*
Корректоры *В. О. Логунова, Т. А. Кошелева*
Подготовка иллюстраций *Е. В. Лапусова*
Выпускающие *Т. А. Столбова, Е. П. Королькова*

ЛР № 065466 от 21.10.97
Гигиенический сертификат 78.01.07.953.П.007216.04.10
от 21.04.2010 г., выдан ЦГСЭН в СПб

Издательство «ЛАНЬ»
lan@lanbook.ru; www.lanbook.com
192029, Санкт-Петербург, Общественный пер., 5.
Тел./факс: (812) 412-29-35, 412-05-97, 412-92-72.
Бесплатный звонок по России: 8-800-700-40-71

Подписано в печать 13.06.12.
Бумага офсетная. Гарнитура Школьная. Формат 84×108^{1/32}.
Печать офсетная. Усл. п. л. 11,76. Тираж 1000 экз.

Заказ № 1192.

Отпечатано
в ОАО «Издательско-полиграфическое предприятие «Правда Севера».
163002, г. Архангельск, пр. Новгородский, д. 32.
Тел./факс (8182) 64-14-54; www.ippps.ru



Геннадий Созырович Качмазов (1960) — кандидат ветеринарных наук (1990), доцент кафедры технологии пищевых продуктов Северо-Осетинского государственного университета им. К. А. Хетагурова (Владикавказ). В 1982 г. окончил ветеринарный факультет Горского сельскохозяйственного института (Орджоникидзе).

Г. С. Качмазов ведет свою научную деятельность в области пищевой микробиологии. В сфере его научных интересов — изучение бактерий, грибов, дрожжей, процессов брожения, а также возможностей применения достижений микробиологии в пищевой и биотехнологической промышленности. В частности, Г. С. Качмазовым было разработано и модифицировано более 10 методик для объективного исследования физиологических и технологических характеристик дрожжей, а также была модифицирована питательная среда для выращивания чистой культуры гриба вешенка.

Безусловными успехами следует считать авторские разработки сухой комплексной закваски пробиотического назначения с использованием физиологически адаптированных культур молочнокислых бактерий для производства кваса брожения, а также сухой комплексной полифункциональной закваски с использованием мультикультуры физиологически адаптированных молочнокислых бактерий для производства уникального кисло-молочного продукта синбиотического назначения с ярко выраженными адсорбционными, детоксицирующими, эвакуаторными и иммуномодулирующими свойствами.

Г. С. Качмазов более 16 лет ведет научно-педагогическую работу, является автором 22 научных статей.



Издательство «Лань»
победитель конкурса по качеству
«Сделано в Санкт-Петербурге»

ISBN 978-5-8114-1343-0



9 785811 413430

