

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю
Кафедра Біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»
Директор інституту(декан факультету)
Грегірчак Н.М.
(підпис) (прізвище та ініціали)

«__» _____ 20__ р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Пирог Т.П.
(підпис) (прізвище та ініціали)

«__» _____ 20__ р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Біотехнологія»

на тему: «Культивування *Saccharomyces cerevisiae* для одержання біомаси»

Виконав: здобувач 5 курсу, групи 1

Бойко Володимир Русланович
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник Стабніков Віктор Петрович
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

(прізвище та ініціали) (підпис)

(прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент Бондар В.І.
(прізвище та ініціали) (підпис)

Засвідчую, що в цій кваліфікаційній
роботі немає запозичень із праць
інших авторів без відповідних
посилань.

Здобувач _____
(підпис)

Київ - 2021р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології
Освітній ступінь Бакалавр
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)
Освітньо-професійна програма «Біотехнологія»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри
біотехнології і мікробіології

Пирог Т.П.
“ 28 ” 10 2021 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Бойко Володимира Руслановича
(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування *Saccharomyces cerevisiae* для одержання біомаси

керівник роботи Стабніков Віктор Петрович, д.т.н., професор,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від “28” жовтня 2020 року № 875

2. Строк подання здобувачем роботи 31 січня 2021 року
3. Вихідні дані до роботи потреба у цільовому продукті: 40000 кг на рік, геометричний об'єм ферментера 50 м³, коефіцієнт заповнення ферментера становить 0,5, кількість трудоднів: 300, втрати 15%, тривалість культивування 12 год, тривалість циклу культивування 22 год, цільовий продукт: дріжджова біомаса *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1530.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Характеристика цільового продукту, Характеристика біологічного агента, Техніко-економічне обґрунтування, Обґрунтування вибору технологічної схеми, Специфікація обладнання, Опис технологічної схеми, Контроль виробництва, Реферат, Вступ.

5. Перелік графічного матеріалу
технологічна схема виробництва біомаси дріжджів формату А1 - 1 аркуш, апаратурна схема виробництва біомаси дріжджів формату А1 - 1 аркуш

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв

7. Дата видачі завдання 28.10.2020р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Опрацювання літератури за темою дипломної роботи	29.10.20-10.11.20	
2	Написання розділу 1. Характеристика цільового продукту	10.11.20-17.11.20	
3	Написання розділу 2. Характеристика біологічного агента	18.11.20-25.11.20	
4	Написання розділу 3. Техніко-економічне обґрунтування	20.11.20-30.11.20	
5	Написання розділу 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми	29.11.20-10.12.20	
6	Написання розділу 5. Специфікація обладнання	11.12.20-18.12.20	
7	Написання розділу 6. Опис технологічної схеми	08.12.20-25.12.20	
8	Написання розділу 7. Контроль виробництва	26.12.20-05.01.21	
9	Оформлення вступу, змісту та кваліфікаційної роботи	29.12.20-10.01.21	
10	Оформлення графічного матеріалу	30.12.20-30.01.21	

Здобувач

_____ (підпис)

Бойко В Р.

_____ (прізвище та ініціали)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Стабніков В П.

_____ (прізвище та ініціали)

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	3
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту.....	7
РОЗДІЛ 2. Характеристика біологічного агента.....	10
2.1. Вибір біолог. агенту та поживного середовища для його культивування.....	10
2.2. Морфолого-культуральні та фіз-біохімічні ознаки біологічного агента.....	20
2.3. Таксономічний статус біологічного агенту.....	23
2.4. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.....	25
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	32
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	32
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	33
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	33
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	34
РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....	37
4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.....	37
4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	37
4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря.....	39
4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	40
4.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	41
РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання.....	43
РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми.....	46
РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва.....	58
7.1. Карта постадійного контролю.....	60
7.2. Мікробіологічний контроль	71
7.3. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	73
7.3.1. Концентрація біомаси.....	73

					НУХТ БТЕК 05.01.01 ДП ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бойко В			Зміст	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Стабніков В П					1	2
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

7.3.2. Концентрація джерела вуглецю і азоту.....	73
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	76
ДОДАТОК.....	81

РЕФЕРАТ

Дипломна робота складається із 95 сторінок друкованого тексту, в тому числі 15 таблиць, 7 рисунків, 56 літературних джерел та одного додатку .

Робота присвячена розробленню технології культивування високопродуктивного штампа *Saccharomyces cerevisiae* з метою біосинтезу біомаси хлібопекарських дріжджів, включаючи опис властивостей мікробіологічного агента як зі сторони фізіолого-біохімічних, морфолого-культуральних властивостей, так і класифікації його що найменш за двома класифікаціями характерними для класифікації родів дріжджів. У роботі охарактеризовано цільовий продукт- дріжджову біомасу за фізичними, та мікробіологічними властивостями. На основі особливостей культивування продуцента розроблено технологію одержання біомаси на його основі з використанням глибинного культивування, що включає підготовчі етапи виробництва(підготовка аераційного повітря, обладнання приміщення, поживних середовищ та допоміжних розчинів) так і етапи технологічного процесу включаючи підготовку посівного матеріалу та культивування продуцента. Було відібрано найбільш продуктивний штам біологічного-агента продуцента для реалізації виробництва біомаси, що дає максимальну концентрацію біомаси з поміж 3 відібраних найбільш перспективних штамів , вона становить 35 г/л. Для одержання такої концентрації біомаси було підібране досить просте поживне середовище на основі меляси(відходу цукрового виробництва) та найбільш сприятливі умови культивування, зокрема рН 4,5, та температура у 30 °С за 12 годин культивування. Перед розробкою технології одержання біомаси був проведений поверхневий аналіз ринку виробників хлібопекарських дріжджів та масштабів виробництва хлібопекарських дріжджів за допомогою інформації одержаної від Державної служби статистики. Після аналізу було розроблене техніко-економічне обґрунтування виробництва із зазначенням кінцевих об'ємів виробництва які необхідно реалізовувати по розробленій технології одержання біомаси дріжджів. За розрахунками потреба у біомасі дріжджів на рік для задоволення потреб по всій території Київської області з врахуванням впливу

інших конкурентних виробництв становить 40000 кг на рік. При врахуванні продуктивності штаму у 35 г/л кількість культуральної рідини становила 1142857 л на рік. Для реалізації такого об'єму було підібрано виробничий ферментер місткістю 10000 л (10 м³).

Для контролю технологічного процесу виробництва були підібрані найбільш прості та ефективні методи контролю основані на методиках аналітичної хімії та мікробіології з використанням специфічного лабораторного обладнання. Включена карта постадійного контролю виробництва.

Робота складається з вступу, п'яти розділів, списку використаних джерел (22 найменування) технологічної та апаратурної схем (формат А1). Загальний обсяг роботи – ... сторінок, ... рисунки, ... таблиць, ... літературних джерел.

Ключові слова: *Saccharomyces cerevisiae*, біомаса, дріжджі, культивування, ТЕО.

ВСТУП

Сучасний стан біотехнології, біоінженерії та біоіндустрії в Україні характеризується наявністю достатнього науково-технічного потенціалу, при високій ринковій потребі промислових харчових сполук (амінокислот, вітамінів, молочної, лимонної, глюконової кислот, та інш), при необхідності енергозбереження та збільшення кормової бази та харчових білків, охорони здоров'я та захисту екосистем довкілля [1].

Біотехнологія є вагомим і перспективним фактором розвитку світового виробництва, застосовується практично у всіх секторах світової економіки та демонструє значні потенційні переваги. Так, біотехнологія допомагає боротися з хворобами, розвиваючи та покращуючи медицину, забезпечуючи населення планети доступними, життєво необхідними препаратами. Значний потенціал біотехнологія має у боротьбі з голодом і може вирішити проблему браку їжі для країн, що розвиваються. Біотехнологія допомагає довкіллю, дозволяючи знизити ризик токсичного забруднення ґрунтів і ґрунтових вод, підвищити ефективність сільського господарства. У промисловості багато технологій замінюються біотехнологіями, що використовують ферменти і мікроорганізми, зокрема, у харчовій галузі, у сфері переробки сільськогосподарських, промислових і побутових відходів, очищення і використання стічних вод, одержання біогазу і добрив [2].

Згідно з прогнозами експертів Організації економічного співробітництва і розвитку (ОЕСР), у 21-му столітті біотехнологія буде відігравати вирішальну роль у політичній та економічній стабільності як у розвинених країнах, так і в тих, що розвиваються, та матиме антропогенний вплив на планеті.

					НУХТ БТЕК 05.01.01 ДП ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бойко В			Вступ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Стабніков В П					1	2
Реценз.						Кафедра БТМ 8		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

В сучасні біотехнології одним з особливо актуальне питань є масове виробництво ферментів-гідролаз для широкого застосування, для харчової промисловості та їх біосинтезу різними продуцентами, вивчення фізико-хімічних властивостей, однакових кислот різних продуцентів. Вирішення цих питань має не тільки фундаментальне значення, але й практичне з точки зору раціонального використання продуцентів з максимальним виходом цільового продукту.

Використовуючи біотехнології рекомбінантних ДНК, можна одержати штами мікроорганізмів, нарощення біомаси яких досягає на 50 % більше ніж таких же не генетично модифікованих [2].

Актуальність На сьогоднішній день виробництво хліба та алкогольних напоїв ринку: максимальна активність напоїв потребує все нових і нових штамів дріжджів, які б задовольняли основні, кількість біомаси і дешевизна поживного середовища для культивування. Оскільки попити на дану продукцію з кожним роком зростає і відбір нових більш продуктивних і дешевих в отриманні штамів дріжджів наразі є дуже актуально і перспективно[3].

Новизна: Зараз виробництво дріжджів для потреб пивзаводів, хлібокомбінатів, інших підприємств та для домашнього використання потребує нових селективних чи генетично модифікованих культивування яких в Україні не реалізовано тож дана тема є новою і дуже актуально[4].

РОЗДІЛ 1

Характеристика цільового продукту.

Загальні відомості

Хлібопекарські дріжджі це продукт мікробного синтезу, який представляє собою пресовану або висушену біомасу дріжджів в залежності від форми випуску: пресовані чи сухі дріжджі. Сухі дріжджів можуть містити захисне середовище, яке вносяться перед сушінням. Основним компонентом хлібопекарських дріжджів є культура *Saccharomyces cerevisiae* в основному використовують раси дріжджів при виробництві(раси являють собою суміш штамів дріжджів, які не змінюють своїх властивостей при пересівах) або використовують певні штами дріжджів метод зберігання культури яких дозволяє при послідовних посівів не втрачати своїх властивостей, а саме зимазної та мальтазної активності (зброджування глюкози та мальтози відповідно) та підйомної сили, яка характеризує продуктивність дріжджів по виділенню вуглекислого газу і забезпечення підйомної сили , що є основною для виробництва хліба.

Оскільки кінцевим продуктом біосинтезу є біомаса дріжджів, яка у подальшому відділяється від культуральної рідини, концентрується, пресується чи висушується за умов, при яких дріжджі будуть зберігати свою активність.

Хімічний склад дріжджових клітин (%): вода – 72-75; сухі речовини – 25-28, зокрема (% на СР): білки та інші азотисті сполуки – 37-50; вуглеводи – 35-45; жири – 1,6-2,5; зольні елементи – 6-10. Зольні речовини складаються з макроелементів – фосфору, калію, магнію, кальцію і мікроелементів – заліза, алюмінію і міді. Для утворення повноцінної біомаси дріжджів живильне середовище повинне містити азот, фосфор, калій, магній, легкозасвоювані форми вуглеводів, мікроелементи та інші речовини. Джерелами вуглецю для дріжджів є моно- і дицукри, а в умовах аерації – спирти, альдегіди і органічні кислоти. Азотним живленням є розчинні органічні і неорганічні сполуки азоту.

					НУХТ БТЕК 05.01.01 ДП ПЗ				
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб.		Бойко В			Розділ 1 Характеристика цільового продукту		Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Стабніков В П						1	2
Реценз.				Кафедра БТМ 10					
Н. Контр.									
Затверд.		Пирог Т.П.							

Основна характеристика хлібопекарських дріжджів це активність, тобто швидкість активації і споживання субстрату з виділенням вуглекислого газу. Що основним розпушуючим агентом при виробництві хлібобулочних виробів.

Пресовані дріжджі мають у складі 30 - 40 % вологи, натомість сухі дріжджі містять до 10 % вологи. Зовнішній вигляд товарних дріжджів у сухій та пресованих формах , *рис 1..1*



Рис 1..1. Зовнішній вигляд товарних хлібопекарських дріжджів(сухі та пресовані)

Найрозповсюдженіші продуценти біомаси дріжджів яку використовують у хлібопекарському виробництві це різні штами *Saccharomyces cerevisiae* [6,7,8].

Властивості дріжджових клітин оптимальні параметри для активації і максимальної ферментативної роботи клітин при розпушенні тіста : діапазон температури для дріжджів 27-33 °С, рН: 4.5...5.5 , анаеробні умови [6].

Продуценти

Основним продуцентом біомаси хлібопекарських дріжджів є штами *Sacharomyces cerevisiae* , їх відсоток відносно інших має становити у готовому препараті 90 % та не менше [6, 8].

Основні характеристики препарату.

Препарат у формі біомаси використовується для розпушення тіста для виробництва хлібобулочних виробів [6, 7].

Склад препаратів і форма випуску

Форма випуску буває: пресовані дріжджі та сухі. Сухі випускають у вигляді висушеної культури у захисному середовищі у вигляді сухих гранул. Вологість

продукту 5-10 %. Термін зберігання 12 місяців. Пресовані дріжджів представляють собою фільтровану вологу біомасу концентрованого дріжджового молока. Вологість становить 70%. Термін зберігання місяць. Сухі дріжджі фасуються для роздріб у упаковки від 15 до 100 г, пресовані у пачки по 100-200 гр. Для оптових продаж фасуються у пакети до 1 кг [7].

Дія препарату:

Після внесення препарату до тіста за рахунок виділення вуглекислого газу під час ферментації дріжджами компонентів тіста воно розпушується і одержує певну структуру[9].

Дозування:

Дозування залежить від способу випікання. Вини бувають опарний та безопарний

Для опарного способу(традиційний) :

Пресовані : 2 %

Сухі 0.66 %

Для безопарного способу:

Пресовані : 1,6-2,5 %

Сухі 0.52- 0.82 %

Для прискореного способу

Пресовані : 2-4 %

Сухі : 0.66 – 1,32 % [8].

РОЗДІЛ 2

2.1 Вибір біологічного агента та поживного середовища для його культивування.

Хлібопекарські дріжджі – представляють собою препарат на основі біомаси з вологістю 10-15 % якщо сухі та 20-25 % якщо пресовані. Сам препарат складається або з концентрованого пресованого дріжджового молока або з сухих клітин дріжджів у захисному середовищі. Всі типи хлібопекарських дріжджів мають такі властивості та показники як загальна активність, активність по гідролізу певних цукрів, глюкози, мальтози інших і продуктивність по вуглекислому газу. Якщо дані дріжджі використовуються у виробництві етанолу, то ще продуктивність біосинтезу етанолу)[4].

Порівняльна характеристика біологічних агентів-продуцентів:

Оскільки цільовим продуктом є біомаса дріжджів одержана культивуванням в аеробних умовах на основі лише *Saccharomyce scerevisiae*, обираємо продуцентів які володіють найбільшою концентрацією біомаси у кінцевому періоді культивування: *Saccharomyce scerevisiae* (Turboyeast; GertStrand AB),, *Saccharomycescerevisiae* NCYC 1530, *Saccharomyces cerevisiae* IMB Y-5009 [9,10,11].

Дріжджі ростуть на одних із найдешевших та найпростіших середовищах на основі меляси, цукру чи кукурудзяного екстракту, деяких гідролізатах та борошна. Та мають найбільшу продуктивність по біомасі та активність виділення вуглекислого газу при додаванні до тістового замісу. Найчастіше, для виробництва хлібопекарських дріжджів використовують різні штами *Saccharomyces cerevisiae* [9,10].

Для порівняння будемо залучати одні з найбільш продуктивних по біомасі штамів *Saccharomycescerevisiae* за такими показниками характерними: Максимальна концентрація біомаси, рН, склад середовища час культивування(табл 1.1)[4.9]. Набір продуцентів буде наступний:

					НУХТ БТЕК 05.01.01 ДП ПЗ						
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата							
Розроб.		Бойко В			Розділ 2 Вибір біологічного агента та поживного середовища			Літ.	Арк.	Акрушів	
Перевір.		Стабніков В П								1	2
Реценз.								Кафедра БТМ			
Н. Контр.											
Затверд.		Пирог Т.П.									

Saccharomyces cerevisiae (Turboyeast; GertStrand AB), *Saccharomyces scerevisiae* NCYC 1530, *Saccharomyces cerevisiae* IMB Y-5009. [9,10,11].

Таблиця 2.1

**Порівняльна характеристика біологічних агентів для біосинтезу
дріжджової біомаси[12,11,10].**

Продуцент	Склад поживного середовища (г/л)	Умови культивування: температура °C ,pH , час культивування (год)	Концентрація біомаси г/л	Література
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Turboyeast; GertStrand AB),	Глюкоза – 20 Бакто-Пептон – 20 Дріжджовий автолізат – 10	t=37 °C pH - 4,5 T = 48	4,8	Claire .M. H, Loveridge Iain S. D.Diane, Kelly .S .L // Co-production of bioethanol and probiotic yeast biomass from agricultural feedstock: application of the rural biorefinery concept//Hulle et al. AMB Express journal.-2014-.Vol 4 - . N 64 P 1–8.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 1530,	(NH ₄) ₂ HPO ₄ – 4,5 NH ₄) ₂ SO ₄ – 4,5 Пантотенова кислота – 1,5 мг М'яса - 200	t=30°C pH – 4,5 T= 12	35	Pat. US 2012/0128853 A1. Method of production of yeast//Salan M.A, Alhassa S.A; Siddig H. H., ; Fahad .M. A. – 24.05.2012
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	М'яса – (	t=30 °C	24 % від	Пат. UA 6 C12N1/00. Штам

<i>visiae</i> IMB Y-5009.	розбавлення 1:17 і вмісті цукру 40.5 %) = 59	pH - 5 T = 24	маси меляси (14 г/ л)	дріжджів <i>Saccharomyces cerevisiae</i> для одержання сушених хлібопекарських дріжджів
---------------------------	--	------------------	------------------------------	--

Опис таблиці та обрання продуцента:

Культивування *Saccharomyces cerevisiae* (Turboyeast; GertStrand AB), є найбільш довготривалим та затратним з економічної точки зору: по-перше час культивування сягає 48 годин, а це майже у 2 довші за найближчий час культивування продуцентів, до того ж температура культивування вища за температуру у попередніх штамів. По-друге середовище містить багато дороговартісних компонентів, таких як пептон та дріжджовий автолізат, і звідси слідує висока вартість поживного середовища культивування. По-третє, штам має найнижчу продуктивність по біомасі, і це найбільш важливий параметер при масовому виробництві дріжджів для застосуванні у виробництві хлібобулочних виробів. Тож даний штам є найменш вигідним для планованого виробництва [12].

Saccharomyces cerevisiae IMB Y-5009. є набагато перспективнішим. Оскільки має найдешевше поживне середовище і відповідно розрахунково найвище співвідношення кількості біомаси на 1 гривню (таблиця 2.3). тобто на одну і ту саму ціну затрачених коштів цей штам дає найбільший вихід продукту, єдиним компонентом поживного середовища для його культивування є меляса, що наймовірно зменшує вартість поживного середовища, тож воно і є найдешевшим з порівнянних. Недоліком цього штаму є те, що має все ж недовготривалу та все ж більшу за найменшу тривалість культивування у 24 години pH і температура культивування не сильно відрізняються від попередніх продуцентів. Однак через те, що основним і єдиним компонентом поживного середовища є меляса, стабільна продуктивність штаму по біомасі буде напряду залежати від її якості, а при сьгоднішніх умовах виробництва цукру меляса має дуже великі розбіжності у складі відносно різних партій, тож різна меляса буде давати різний вихід

дріжджової біомаси і це понесе економічні втрати при виробництві, які точно прорахувати неможливо. Тож хоч даний штам і має суттєво високу концентрацію біомаси відносно попереднього у 14 грам на літр, все його застосування є досить ризикованим для великих масштабів [10].

Поживне середовище для культивування штаму *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1530 є досить складне. Містить декілька факторів росту таких, як пантотенова кислота та інозитол, вони є досить дорогими і піднімають у ціні вартість поживного середовища, але оскільки їх концентрації дуже невисокі їх можна не враховувати як дорогі компоненти. Загалом вартість поживного середовища виходить невисока, ще і через те, що основним компонентом і субстратом є м'ясо як джерело вуглецю та солі амонію як джерело азоту. Співвідношення витрат на поживне середовище відносно одержаної біомаси є не надто високе і не надто мале, - оптимальна золота середина, однак у цьому випадку продуктивність по біомасі у штаму просто рекордна: за час культивування при 30 °C за pH 4,5 за 12 годин досягається 35 г/л біомаси, що вкрай важливо при виробництві дріжджової біомаси як продукту. Даний штам за переліченими вище ознаками є найбільш вигідний.[11].

Висновок: На основі вище наведеної порівняльної характеристики обираємо продуцента промислового культивування з метою одержання біомаси хлібопекарських дріжджів: *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1530, оскільки він володіє найвищою швидкістю росту: 2,91 г/год, має найменший час культивування, накопичує на даному поживному середовищі найбільшу концентрацію біомаси: 35г/л. І хоча умовна собівартість біомаси у даного штаму не найнижча порівняно з *Saccharomyces cerevisiae* IMB Y-5009, у якого вона становить 0,016 а у обраного 0,55 г/л у штаму *Saccharomyces cerevisiae* IMB Y-5009, основний і єдиний компонент середовища – м'ясо, тож кількість біомаси яку вони зможуть накопичити на пряму залежить від якості м'яса, а обраного штаму *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1530 середовище містить багато факторів росту та солей- джерел мікро та макроелементів, що робить продуктивність даних дріжджів менш залежною від якості м'яса[11,10].

Таблиця 2.1.2

Порівняння вартості поживних середовищ штамів-продуцентів[15-23].

Продуцент	Склад поживного середовища	Концентрація компонентів (г/л)	Ціна компонентів (грн/кг)	Вартість компонентів (грн)	Загальна вартість поживного середовища за 1 л
<i>Saccharomyc escerevisiae</i> (Turboyeast; GertStrand AB),	Глюкоза	20	27,55	0,54	15,16
	Бакто-Пептон	20	720	13	
	Дріжджовий автолізат	10	162	1,62	
<i>Saccharomyc escerevisiae</i> NCYC 1530,	(NH ₄) ₂ HPO ₄	4,5	19	0,085	0.89
	(NH ₄) ₂ SO ₄	4,5	10	0,045	
	Пантотенова кислота	1,5 мг	470	0,0007	
	Меляса	200	3,8	0.76	
<i>Saccharomyc escerevisiae</i> IMB Y-5009.	Меляса розбавлення 1:17 і вмісті цукру 40,5 %)	59	3,8	0,224	0,224

Примітка 1 Ціни на компоненти поживних середовищ взяті з українських промислових інтернет магазинів, станом на 2019 рік, та компоненти закордонного виробництва переведені у ціну національної валюти згідно чинного курсу доллар-гривня станом на 04.03.2019.

У табл. 2.2 наведено вартість компонентів поживних середовищ та 1 л середовища для культивування продуцентів *Saccharomyces cerevisiae* (Turboyeast; GertStrand AB), *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1530, *Saccharomyces cerevisiae* IMB Y-5009. Ціни відповідно становлять 15,26; 1,94 та 0,224 гривні за 1 л відповідно.

Перший штам має найдорожче поживне середовище через високу концентрацію в ньому дорогих компонентів білкового походження. *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1530 має середнє по ціні поживне середовище. Та кілька дорогих компонентів у склад при цьому їх вміст незначний і ціна на середовище відповідно теж, до того ж всі компоненти можна взяти вітчизняного походження. Останній штам *Saccharomyces cerevisiae* IMB Y-5009 культивується на найдешевшому поживному середовищі- розчині меляси, проте його продуктивність може повністю залежати від складу конкретної партії меляси.

Таблиця 2.1.3

Умовна вартість 1 цільового продукту при культивуванні *Saccharomyces cerevisiae* (Turboyeast; GertStrand AB), *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1530, *Saccharomyces cerevisiae* IMB Y-5009[15-23].

Біологічний агент	Вартість 1л середовища грн	Максимальна концентрація біомаси г/л	Умовна вартість біомаси грн/г розраховуючи на л середовища	Тривалість культивування, год	Питома продуктивність, г/год
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Turboyeast; GertStrand AB),	14,24	4,8	2,96	48	0,1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 1530	0.89	35	0,025	12	2,91

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IMB Y-5009.	0,224	14	0,016	24	0,58

З таблиці видно, що штам *Saccharomyces cerevisiae* (Turboyeast; Gert Strand AB), має найнижчу продуктивність по біомасі за 1 гривню, оскільки ціна поживного середовища перебиває концентрацію біомаси. Натомість штам *Saccharomyces cerevisiae* IMB Y-5009 є повною протилежністю попередньому, тут ціна поживного середовища наймінімальніша, а продуктивність по біомасі досить висока, та і середовище за складом компонентів є найпростішим, а це вкрай важливо для великих обсягів виробництва. *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1530 є «золотою серединою» оскільки має дуже високу концентрацію біомаси при виході за 12 годин. І культивується на досить складному але в той же час не дуже дороговартісному поживному середовищі. Оскільки дорогі компоненти вносяться у мікродозах. Тож даний штам має оптимальне співвідношення ціна поживного середовища - вихід біомаси.

Наведення складу поживного середовища.

Поживне середовище для вирощування інокуляту не буде відрізнятися від виробничого оскільки основним параметром продуктивності є накопичення біомаси, а для її накопичення не обов'язково змінювати склад поживного середовища для інокуляту, це по першу збільшить вартість виробництва, по-друге збільшить тривалість лаг-фази тобто адаптації культури до основного поживного середовища [9,13,14].

Середовище для інокуляту буде наступного складу (табл 2.4)

Оскільки середовище у першому варіанті складу містить 400 г меляси у літрі середовища, це дає велике навантаження на клітини дріжджів та не несе відносно високого виходу біомаси після 6-7 годин культивування, оскільки повністю не споживається тому у подальшому коректно буде зменшити концентрацію меляси

до 200 г/л. Це зменшить вартість поживного середовища та не вплине на кінцеву концентрацію меляси.

Таблиця 2.1.4

Склад поживного середовища для вирощування посівного матеріалу та посівного матеріалу(г/л) *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1530 [10].

Компонент	Концентрація компонентів, г/л
Меляса	200(80 г/л для посівного матеріалу та початку виробничого культивування + 120 г для порційного підживлення під час промислового культивування.
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	4,5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4,5
Пантотенова кислота	1,5 мг
pH	4,5

Перевірочний розрахунок повноцінності складу поживного середовища для забезпечення росту клітин дріжджів до відповідної концентрації біомаси за вуглицем.

Розрахунок по концентрації карбону.

Основним субстратом і джерелом карбону у обраному середовищі є м'ясо, яке на 50-55 % складається з сахарози. При концентрації у 200 г/л на літр загальна кількість сахарози буде становити 100 г.

Хімічна формула сахарози - $C_{12}H_{22}O_{11}$, тож відштовхуємося від неї. Відсоток вуглецю у сахарозі (12 атомів молекулярною масою 12 кожний) становить :

$$\square_1 = (100 \times 144) / 342 = 42 \%$$

Розраховуємо масу вуглецю у 200 г/л м'яса (100 г сахарози) :

$$G = (42 \times 100) / 100 = 42 \text{ г/л}$$

Розрахована маса вуглецю, потребує поправку на холосте окиснення у 50 % оскільки половина вуглецю витрачається на холосте окиснення при рості продуцента. При поправці на холосте окиснення маса вуглецю для чистого засвоєння становитиме 21 г/л.

Максимально можлива кількість біомаси за вуглицем

Вміст вуглецю у біомасі клітин дріжджів становить 50 -52 % відносно сухої біомаси (приймаємо 50 %) , тож з 21 г/л вуглецю з сахарози зможе утворитися відповідна кількість біомаси:

$$G_m = 0,5 / 21 = 42 \text{ г/л}$$

Висновок: Після розрахунку можливої кількості біомаси, яка може насинтезуватися на даному середовищі з м'ясою у поживному середовищі у якості субстрату було визначено, що на даному поживному середовищі може теоретично утворитися 42 г/л сухої біомаси. Оскільки у першоджерелі максимально концентрація біомаси становила 35 г на літр дане поживне середовище повністю задовольняє потребу у накопиченні дріжджової біомаси.

Обґрунтування складу композицій та режимів стерилізації поживного середовища.

Параметри культивування штаму *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1530 є досить специфічними, в основному через низьке рН, яке становить 4,5. Не враховуючи температуру у 30 °С та аеробні умови, за тривалості 12 годин культивування сторонні культури бактерій окрім ацидофільних наврядчи виростуть, до того ж концентрація субстрату у 200 г/л при якій дріжджі дуже гарно ростуть є непридатною для росту майже всіх видів бактерій. Проблему можуть становити сторонні види дріжджів, які здатні рости при таких параметрах і мають більшу швидкість росту наприклад дріжджі *Candida*, *Hanseluna* та інші. А оскільки для виробництва хлібопекарських дріжджів дуже важлива чистота культури з певними властивостями середовище для культивування має бути стерильне.

Для стерилізації компонентів поживного середовища їх потрібно поділити на композиції, стерилізація яких буде проводитися в автоклаві великого об'єму, збірниках чи робочих ферментерах[9]

Таблиця 2.1.5

Склад компонентів поживного середовища для промислового культивування

Компонент	Концентрація компонентів, г/л
М'яса	200
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	4,5
Пантотенова кислота	1,5 мг
рН	4,5

Оскільки рН буде підтримуватися на рівні, що відрізняється від початкового рН середовища тож необхідним буде підготовка титрувальних розчинів кислоти та лугу для встановлення його на даному рівні та подальшої підтримки.

На основі складу поживного середовища складаємо композиції для стерилізації :

Композиція А: Меляса , режим стерилізації: 121°C протягом 20 хв)[9]. Склад композиції пояснюється необхідністю окремої стерилізації меляси від солей через процес освітлення з додаванням сульфатної кислоти. Що може спровокувати випадіння фосфорних солей у осад. Інозитол входить до даної композиції пояснюється його поганою розчинністю у воді(від 0, 17 до 0,2 г на літр при 25-30 °C), що робить неможливим приготування з нього концентрованих розчинів, тим паче він є досить терmostійкий і витримує температуру стерилізації і це зменшить кількість допоміжних ємностей[28]

Композиція Б : $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, режим стерилізації: 131°C, 30 хв)[9]. Склад композиції ґрунтується більш жорсткими умовами стерилізації, які здатні витримати солі, (підкислення буде сильним, буде нерозтворим осадок)а також відсутністю взаємодії між компонентами цієї композиції і наявністю у попередній композиції солей у реакції з якими може випасти осад(сульфати і фосфати) [28].

Композиція В: Пантотенова кислота (режим стерилізації 121 °C протягом 20 хвилин). Склад композиції та режим стерилізації пояснюється хорошою розчинністю пантотенової кислоти і можливістю приготування концентрованого розчину, досить малою її кількістю, що передбачає внесення певної кількості концентрованого розчину перед початком культивування у поживне середовище, та досить високою терmostійкістю даної речовини, що дозволяє їй витримувати температуру стерилізації[9,29].

При можливості пониження рН до 4,5 у розчині можливо об'єднати **Композиції А і Б у Композицію А** з режимом стерилізації 121°C на 20 хвилин.

Для зменшення кількості стерилізаційного обладнання композиція з солями буде стерилізуватися у робочому ферментері.

2.2. Морфолого-культуральні ознаки

Клітини дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* мають кулясту або округлу трохи витягнуту форму іноді наявні бруньки. Клітинна стінка складається переважно з глюканів та мананів які розташовані у 2 шари а між ними є проміжок із білкових молекул , а над манановим шаром. Що знаходиться зверху знаходиться прошарок 2 його фосфорильованого похідного(фосфоманану) шарів : первинного та вторинного. Первинний шар (матричний скелет). Дріжджі також здатні до утворення спор для розмноження, хоча зазвичай розмножуються брунькуванням. [9].

Розмножуватися може як статеве, вегетативе(брунькування) так і безстатеве, при безстатевому розмноженні утворює велику кількість спор які переносяться повітрям, а при статевому утворює специфічні структури – аски, які зливаючись утворюють нову дріжджову клітину (процес називається злиття асків)

При рості та розмноженні можуть утворювати частково псевдоміцелій коли під час брунькування коли дочірні клітини не відділяються від материнських, проте це рідкість. Більш конкретну будову дріжджової клітини дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*.(рисунок 2.2.1)

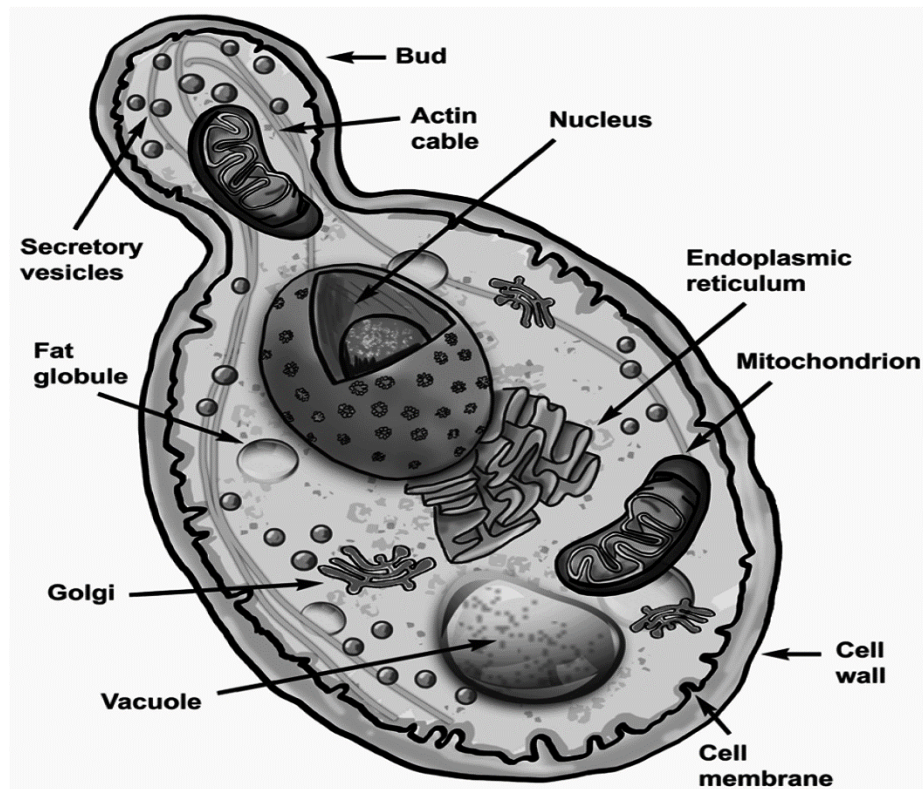


Рис. 2.2.1..Будова дріжджової клітини [34].

Досить реалістичне зображення і чітке зображення дріжджової клітини можна побачити під світловим мікроскопом(збільшення на 40 чи на 90 через те, що розмір клітин досить великий 5- 10 мкм (рис.2 .2.2)[35].

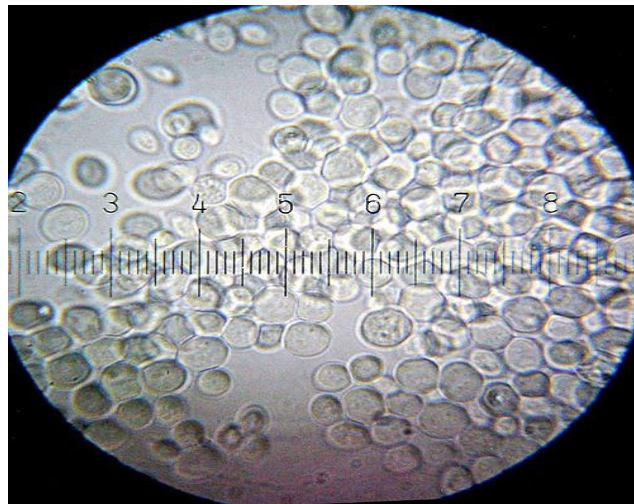


Рис. 2.2.2. Світлова мікроскопія дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* [36].

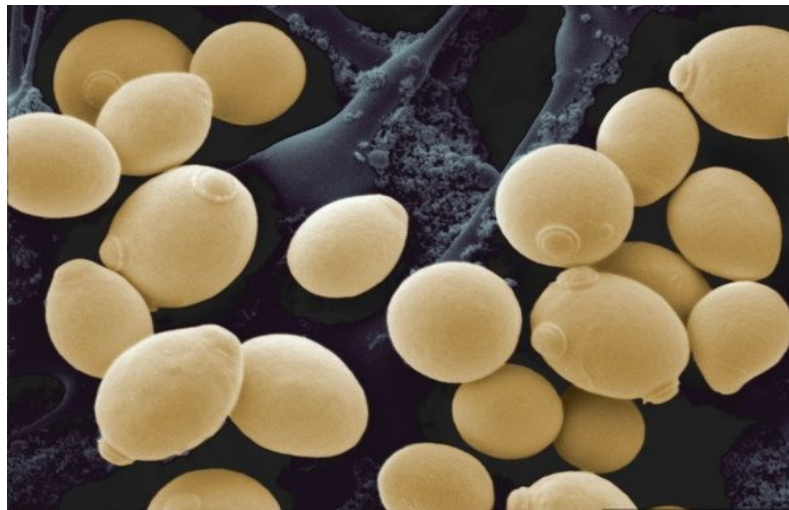


Рис 2.2..3 Електронна мікроскопія *Saccharomyces cerevisiae*

Колір колоній на агаризованих поживних середовищах як правило від білого-кремо жовтого до жовтуватого і темніє зі старінням колонії.(рис.2.2.4) [13].

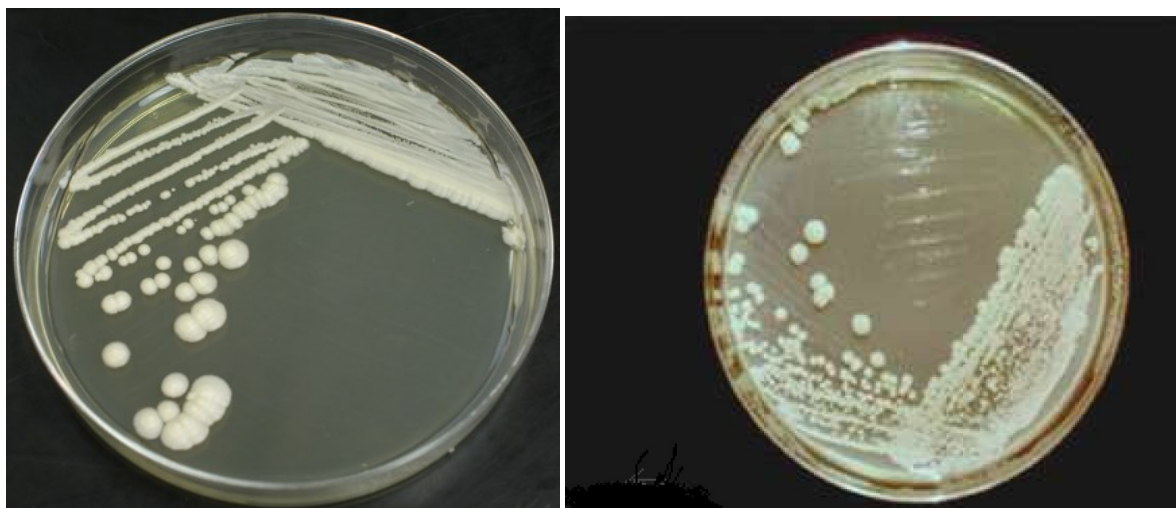


Рис.2.2.4. Характер росту *Saccharomyces cerevisiae* на агаризованих поживних середовищах [37].

. Фізіолого-біохіміні ознаки

Дані дріжджі за типом живлення є хемоорганогетеротрофом, тобто використовують як донор електронів, джерело вуглецю – органічні речовини, а джерело енергії – хімічні реакції. По відношенню до осмотичного тиску є осмоотолерантним. Температурний діапазон оптимальних умов росту

Saccharomyces cerevisiae складає близько 30-35 ° С. Може рости в межах рН від 4,2 до 5,5; оптимальне значення 4,5-5 [9].

По відношенню до кисню аероби та факультативні анаероби тобто потребує кисню для окиснювальних процесів дихання в звичайних умовах, а в умовах без кисню переходить на бродильний тип метаболізму. Можуть асимілювати і споживати різні моно і дисахариди такі як глюкоза маноза, галактоза, сахароза мальтоза целобіоза, деякі полісахариди полісахаридної такі, як, декстрин, крохмаль(лише в аеробних умовах), може споживати пептон, і інші продукти білкової природи[9].

2.3 Таксономічний статус.

Дріжджі подібно до грибів класифікують за способами їх розмноження (статеве, безстатеве, вегетативне), за фізіологічними ознаками, також класифікують за наявністю та відсутністю статевого розмноження. Оскільки дріжджі подібно до грибів – це дуже гетерогенна група мікроорганізмів то на відміну від бактерій їх класифікація постійно змінювалася : одні таксони з'являлися інші зникали, а також класифікацією дріжджів у один час займалися різні науковці і до того ж без однакових критеріїв для класифікації(як у бактерій) тому у різних класифікаціях одні і ті ж таксони називаються по різному. Зазвичай при ідентифікації вже відомих видів грибів наводять кілька класифікацій [9].

Перші класифікації базувалися лише на морфолого-фізіологічних властивостях грибів, наступні класифікації враховувала й належність видів до певних місць існування та їх адаптацію до цих умов [9].

У 1980 -1990 рр. було розроблену першу класифікацію дріжджів, яка базувалася на морфолого-культуральних і фізіолого-біохімічних ознаках. А саме у 1984 р.

У 2000-х років було створено класифікацію Куртсцмана та прикладено у її створенні такі підходи до класифікації: 1) використання молекулярних методів дослідження, 2) швидке оновлення старих і опублікування нових класифікацій грибів.

А аж у 2006 р опубліковано було опубліковано філогенетичну класифікацію аскоміцетних дріжджів, у якій було реалізовано генетичні методи аналізу для класифікації дріжджів. (табл. 3.1.1). Дана класифікація була опублікована на сайті www.fieldmuseum.org/myconet. Проте зараз інформація про таксономію грибів постійно оновлюється в режимі «on-line». На сьогодні ця інформація міститься у таких базах даних як GenBank , Myconet [9]

Таблиця 3.1.1

Класифікації *Saccharomyces cerevisiae* за трьома класифікаціями (1984 р; Куртсмана 2000 р ; Філогенетична класифікація аскоміцетних дріжджів.)

Таксономічна група	Класифікація 1984 р [9]	Класифікація Куртсмана(2000 р.) [9]	Філогенетична класифікація дріжджів(2006 р.) [9]
Відділ	-	-	-
Підвідділ	<i>Ascomycotina</i>	-	<i>Ascomycotina</i>
Клас	<i>Hemiascomycetes</i>	<i>Hemiascomycetes</i>	<i>Saccharomycetes</i>
Порядок	<i>Endomycetales</i>	<i>Saccharomycetales</i> (<i>Endomycetales</i>)	<i>Saccharomycetales</i>
Родина	<i>Saccharomycetaceae</i>	<i>Saccharomycetaceae</i>	<i>Saccharomycetaceae</i>
Рід	<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces</i>
Вид	<i>cerevisiae</i>	<i>cerevisiae</i>	<i>cerevisiae</i>

2.4. Схема біотрансформації ростового субстрату.

Біосинтез біомаси *Saccharomyces cerevisiae*

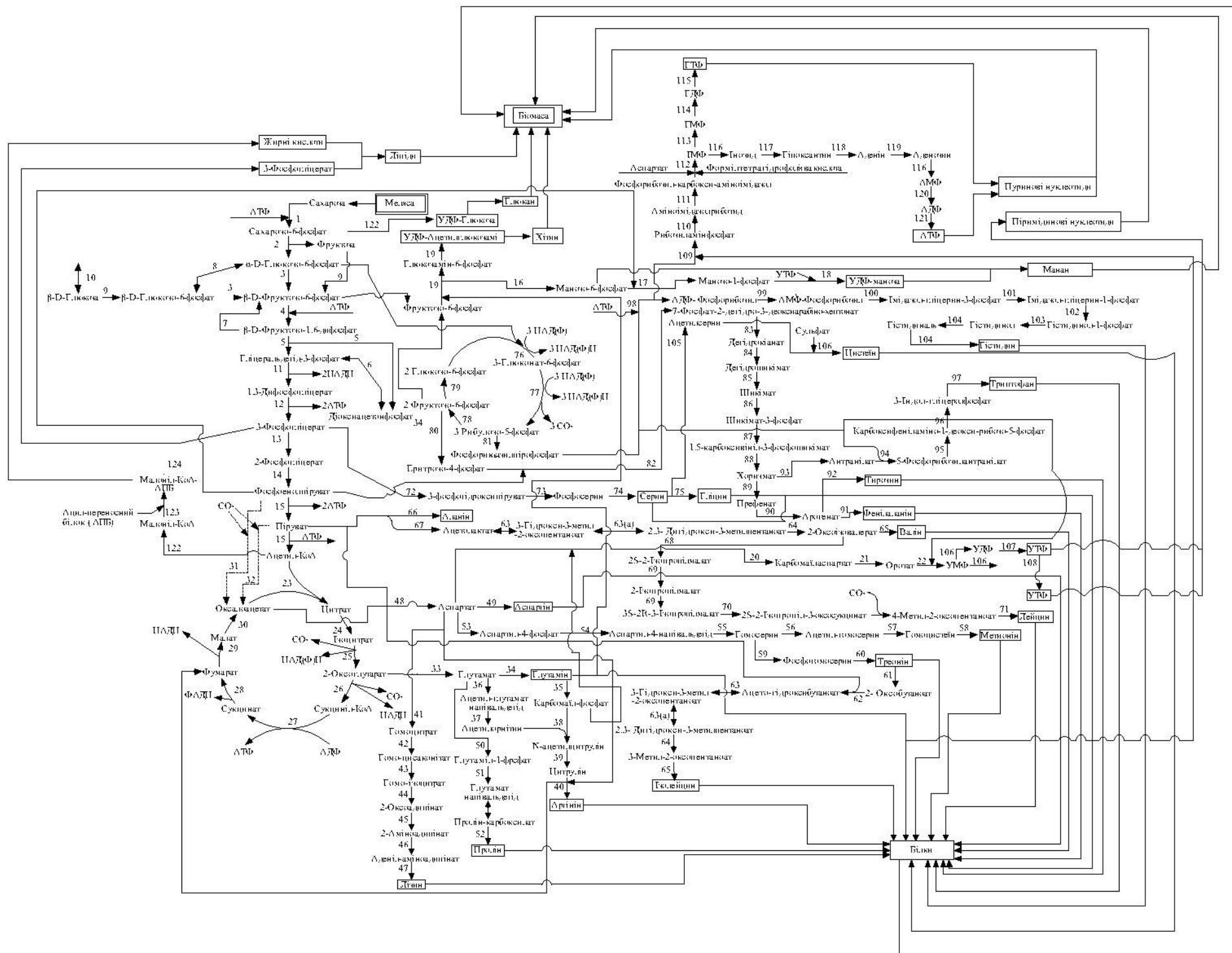
Під час росту *Saccharomyces cerevisiae* на середовищі 1 сахароза перетворюється на глюкозу та фруктозу. Глюкоза та фруктоза включаються у гліколіз та катаболізується до пірувату [38]. У якому утворюється половина попередників основних метаболітів для біосинтезу біомаси. Таких як фосфогліцерат, ФЕП, фруктозо-6-фосфат, піруват. Які є попередниками половини амінокислот. Також жирних кислот і полісахариду пептидоглікану.

Далі піруват перетворюється на ацетил КоА за участі дигідроліпоаміддегідрогенази (КФ 1.8.1.4), який включається у ЦТК[38].. Де утворюється друга частина попередників 20 основних амінокислот, пуринів, піримідинів. Також, невід'ємним джерелом потрібних інтермедіатів для біосинтезу останніх і ароматичних амінокислот є пентозофосфатний цикл. У якому утворюється еритрозо-4-фосфат і фосфорибозилпірофосфат.

Жирні кислоти утворюються полімеризацією ацетил-КоА через Ацил-переносний-білок (АПБ).

Особливістю даного продуцента є специфічні для дріжджів полісахариди манан і глюкан з манози і глюкози відповідно через фосфорильовані похідні.

А також характерна для еукаріотів особливість- синтез лізину через аміноадипінову кислоту[39, 40, 41, 42]. Схема перетворення глюкози на біомасу наведено на *рис.2.4.1*



Умовні позначення: Суцільна лінія- основний шлях метаболізму, штрихова- анаплеротичні реакції.

Ферменти: 1- фосфотрансфераза (КФ2.7.1.211); 2 - бета-фруктофуранозидаза (КФ 3.2.1.26); 3- глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9); 4 – фосфоглюкокіназа (КФ 2.7.1.11); 5 – фруктозо-біфосфатацьдолаза клас 2 (КФ4.1.2.13); 6 – тріозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); 7 – фруктозо-1,6-біфосфатаза клас 2 (КФ3.1.3.11); 8- глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9), глюкозо-6-фосфатепімераза (КФ 5.1.3.15); 9 – гексокіназа (КФ 2.7.1.1); 10 – альдозо-1-епімераза (КФ 5.1.3.3); 11- гліцеральдегід- 3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 12- фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 13 – 2.3 –біфосфатзалежна фосфогліцератмутаза (КФ5.4.2.11); 14 – енолаза (КФ 4.2.1.11)); 15- піруваткіназа (КФ 2.7.1.40)[7], 16 - манозо-6-фосфатізомерази (КФ 5.3.1.8); 17 фосфоманнозомутаза (КФ 5.4.2.8); 18- манозо-1-фосфатгуанілтрансфераза(КФ 2.7.7.13); 19 – глюкозоамін-фруктозотрансфераза(КФ 2.6.1.16); 20- глюкозамінацетилтрансфераза(КФ 2.3.1.4), фосфоацетилглюкозамінмутаза(КФ 5.4.2.3), ацетилглюкозаміндифосфорилаза(КФ 2.7.7.23), хітинсинтаза (КФ 2.4.1.16) ; 21- дигідрооротаза (КФ 3.5.2.3), дигідрооротатдегідрогеназа (КФ 1.3.1.14); 22- оротатфосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.10), орнітинфосфатдекарбоксилаза (КФ 4.1.1.23); 23- цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1); 24 - аконітатгідратаза (КФ4.2.1.3); 25 - ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42); 26 - дигідроліпоаміддегідрогенази (КФ 1.8.1.4); 27 - сукциніл-КоА синтетаза, альфа-субодиниця (КФ 6.2.1.5); 28 - сукцинатдегідрогеназа, цитохром b 556 субодиниця; 29 — фумаратгідратаза, клас II (КФ 4.2.1.2); 30 — малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37); 31 — фосфоенолпіруваткарбоксилаза (КФ 4.1.1.31); 32 - піруваткарбоксилаза (КФ 6.4.1.1) 33 – глютаматсинтаза НАДН/НАДФН залежна(КФ, 1.4.1.13), глютаматсинтаза НАДН залежна(КФ, 1.4.1.14); 34 – глютамінсинтаза(КФ6.3.1.2); 35 –карбомаїл-фосфат синтаза (КФ 6.3.5.5); 36- ацетилглютаматсинтаза (КФ 2.3.1.1), ацетилглютаматкіназа (КФ 2.7.2.8), ацетил-гама-глютамінфосфатредуктаза (КФ 1.2.1.38); 37 – ацетил-орнітинамінотрансфераза (КФ 2.6.1.11) 38 – ацетил-орнітин-карбомал-трансфераза

(КФ.2.1.3.9); 39- ацетил-орнітиндеацетилаза (КФ 3.5.1.16); 40- аргініно-сукцинатсинтаза (КФ 6.3.4.5), аргініно-сукцинатліаза (КФ 4.3.2.1); 41 – аспартаткіназа (КФ 2.7.2.4), аспартат-напівальдегіддегідрогеназа (КФ 1.2.1.11); 42 – тетрагідродипіконіатсинтаза (КФ 4.3.3.7), дипіконіатредуктаза (КФ 1.17.1.8); 43 – ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.89), 44 – амінотрансфераза (КФ 2.6.1.-), 45 ацетилдіамінопімелатдиацетилаза (КФ 3.5.1.47); 46 – діамінопімелатепімераза (КФ 5.1.1.7); 47 – діамінопімелатдекарбоксилаза (КФ 4.1.1.20); 48 – аспартатамінотрансфераза (КФ 2.6.1.1); 49 – аспаргінсинтаза (КФ 6.3.1.1); 50 – глутаматкіназа (КФ 2.7.2.11) 51 – глутамат-напівальдегіддегідрогеназа (КФ 1.2.1.41); 52 – пролін-карбоксилатредуктаза (КФ 1.5.1.2); 53 – аспартаткіназа (КФ 2.7.2.4); 54 – аспартат-напівальдегіддегідрогеназа (КФ 1.2.1.11); 55 – гомосериндегідрогеназа (КФ 1.1.1.3); 56 – гомосерин-ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.31); 57 – ацетил-гомосеринліаза (КФ 2.5.1.49), цистеїн-гама-синтаза (КФ 2.5.1.48); 58 – гомосерин-метил-трансфераза (КФ 2.1.1.10), бетаїн-гомоцистеїн-метил-трансфераза (КФ 2.1.1.5), метіонінсинтаза кобаламін незалежна (КФ 2.1.1.14), метіонінсинтаза кобаламін залежна (КФ 2.1.1.13); 59 – гомосеринкіназа (КФ 2.7.1.39); 60 – треонінсинтаза (КФ 4.2.3.1); 61 – треоніндеаміназа (КФ 4.3.1.19); 62 – ацето-лактатсинтаза (КФ 2.2.1.6); 63(а) – кето-редуктоізомераза (КФ 1.1.1.86), (в) 2-ацетолактатмутаза (КФ 5.4.99.3); 64 – дигідроксидегідратаза (КФ 4.2.1.9); 65 – трансаміназа В (КФ 2.6.1.42), лізиндегідрогеназа (КФ 1.4.1.9); 66 – аланіндегідрогеназа (КФ 1.4.1.1); 67 – ацетолактатсинтаза (велика субодиниця) (КФ 2.2.1.6); 68 – 2-ізопропілмалатсинтаза (КФ 2.3.3.13); 69 – ізопропілмалатдегідрогеназа (КФ 4.2.1.33); 70 – 3-ізопропілмалатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.85); 71- лейцинтрансфераза (КФ 2.6.1.6); 72- 3-фосфогліцератдегідрогеназа (КФ 1.1.1.95); 73- фосфосеринамінотрансфераза (КФ 2.6.1.52); 74- фосфосеринфосфатаза (КФ 3.1.3.3); 75 – гліцингідроксиметилтрансфераза (КФ 2.1.2.1); 76- глюкозо-6-фосфатгідрогеназа (КФ 1.1.1.49); 77 – глюконат-6-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.44) , фосфоглюконатдегідрогеназа декарбоксилювальна (КФ 1.1.1.343); 78 - трансальдолаза (КФ 2.2.1.1); 79 - глюкозо-6-фосфатізомереза (КФ 5.3.1.9); 80 - транскетолаза (КФ 2.2.1.1); 81-рибозофосфатпірофосфокіназа (КФ 2.7.6.1); 82 - 3-дезоксид-7-фосфоептулонат синтаза(КФ 2.5.1.54); 83 - дегідрокіанатсинтаза (КФ 4.2.3.4); 84 - 3-

дегідрокіматдегідрогеназа (КФ 4.2.1.10) 85- шикіматдегідрогеназа (КФ 4.2.1.10); 86 - шикіматкіназа (КФ 2.7.1.71); 87- 3-фосфошикімат-1-карбоксивінілтрансфераза (КФ 2.5.1.19); 88 - хоризматсинтаза (КФ 2.5.1.19); 89 - хоризматмутаза (КФ 5.4.99.5); 90 - амінотрансфераза ароатична (КФ 2.6.1.57), аспартат-префенатамінотрансфераза (КФ 2.6.1.78), глутамат-префенатамінотрансфераза (КФ 2.6.1.79); 91 - префенатдегідрогеназа (КФ 4.2.1.51), 92-агрогенатдегідрогеназа (КФ 1.3.1.43), агрогенатдегідрогенада НАДФ⁺ залежна (КФ 1.3.1.78), агрогенатдегідрогеназа НАД(Ф) + залежна (КФ 1.3.1.79); 93 – антранілатсинтаза (КФ 4.1.3.27); 94 – антранілатфосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.18); 95 – фосфорибозилантранілатізомераза (КФ 5.3.1.24); 96 – індол-3-гліцеролфосфатсинтаза (КФ 4.1.1.48); 97 – триптофансинтаза (КФ 4.2.1.20); 98 – АТФ-фосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.17); 99- АТФ дифосфорибозилтрансфераза (КФ 3.6.1.31); 100- фосфорибозил-АМФ-циклогідролаза (КФ 3.5.4.19), імідазолкарбоксамідізомераза (КФ 5.3.1.16); 101 – імідазол-гліцеролфосфатдегідрогеназа (КФ 4.2.1.19); 102 – гістидинолфосфаттрансаміаза (КФ 2.6.1.9); 103 – гістидинолфосфатаза (КФ 3.1.3.15); 104- гістидинолдегідрогеназа (КФ 1.1.1.23); 105 – серинацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.30); 106 – уридинкіназа (КФ 2.7.4.22); 107 – нуклеозиддифосфаткіназа (КФ 2.7.4.6); 108 – ЦТФ-синтаза (КФ 6.3.4.2); 109 – амінодифосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.14); 110 – фосфорибозиламінлігаза (КФ 6.3.4.13), фосфорибозилгліцинамідформілтрансфераза (КФ 2.1.2.2), фосфорибозилгліцинамідсинтаза (КФ 6.3.5.3), фосфорибозилгліцинамідлігаза (КФ 6.3.3.1), 111 – карбоксиламіно-імідазол – рибонуклеотидсинтаза (КФ 6.3.4.18), карбоксиламіно-імідазолрибонуклеотидсинтаза (КФ 5.4.99.18); 112 – імідазол-сукцинокарбоксиламідсинтаза (КФ 6.3.2.6), аденілосукцинатліаза (КФ 4.3.2.2), ІМФ- циклогідролаза (КФ 2.1.2.3), 113 – інозидмонофосфатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.205), ГМФ – синтаза (КФ 6.3.5.2); 114 – гунідинкіназа (КФ 2.7.4.8); 115- нуклеозиддифосфаткіназа (КФ 2.7.4.6); 116 – нуклеотидфосфоестераза (КФ 3.1.3.5); 117 – пуриннуклеозидфосфорилаза (КФ 2.4.2.1); 118 – аденін-діаміаза (КФ 3.5.4.2); 119 – пуриннуклеозидфосфорилаза DeoD тип (КФ 2.4.2.1); 120 – аденілаткіназа (КФ 2.7.4.3); 121 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40), нуклеозиддифосфаткіназа (КФ 2.7.4.6); 122- ацетил- КоА-карбоксилаза (КФ 6.3.4.14),

біотинкарбоксилаза (КФ 6.4.1.2); 123 – маліл-переносний білок (трансилаза) (КФ 2.3.1.39); 124 – синтаз жирних кислот субедин. альфа (КФ 2.3.1.86)(FabS2), 3-оксоацил(Ацил-переносний білок) (КФ 2.3.1.179) (FabF); 125- УДФ-глюкозофосфаттрансфераза(КФ 2.7.7.9); [39, 40, 41, 42]

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Основне направлення застосування дріжджів це хлібо-пекарська та алкогольна промисловість. Оскільки кожна з цих промисловостей висуває свої вимоги до дріжджів включаючи спец-властивості необхідно визначитися з їх направленням. Обираємо направлення застосування дріжджів у хлібопекарській промисловості як основного агента розпушування тіста оскільки дана властивість дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* є досить вираженою та притаманна дріжджам обраного штаму *Saccharomyce scerevisiae* NCYC 1530.

Для розрахунку потреби наводимо статистичні дані щодо виробництва хліба в Україні конкретно по областях.

Таблиця 3..1

					НУХТ БТЕК 05.01.01 ДП ПЗ								
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ				Літ.		Арк.	Аркушів	
Розроб.	Бойко В										1	38	
Перевір.	Стабніков В П												
Реценз.													
Н. Контр.													
Затверд.	Пирог Т.П.												

Обсяги виробництва хліба за 2020 році [43,44]

Області	Обсяги виробництва хліба, тис тон
Дніпропетровська	82,9
Київська	70
Харківська	48,9

Обираємо для розрахунку потужностей виробництва Київську область оскільки вона є найближчою з усіх регіонів щодо доставки та логістики виготовленої продукції особливо у формі вологого продукту.

3.2. Розрахунок потужності виробництва.

У середньому рецептура хліба передбачає використання сухих дріжджів для виробництва хліба у співвідношенні: 1 кг дріжджів на 175 кг хліба.

У Київській області за статистикою 2020 року було вироблено 70 тис тон хліба за рік. Розрахункова потреба буде спиратися на ці дані. Отже необхідно виготовити таку кількість дріжджів, щоб вона влаштовувала попит на 70 тис. тон хліба. 70 тис тон = 70000000 кг хліба. На таку кількість хліба кількість дріжджів відповідно становитиме:

$70000000/175 = 400000$ кг дріжджів. Оскільки на ринку київської області представлено щонайменше 10 брендів марок дріжджів, необхідно врахувати місце

на ринку нової випущеної продукції. Приймаємо за потребу 10 частину розрахованої потреби. Вона становитиме :

$400000/10 = 40000$ кг дріжджів. Враховуючи концентрацію дріжджової біомаси у культуральній рідині , що становить 35 грам на літр можна розрахувати річний об'єм культуральної рідини:

$$(40000 \cdot 1000) / 35 = 1142857,1 = 1142857 \text{ л на рік}$$

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.

Для забезпечення потреби необхідно 1142857 л культуральної рідини на рік:

- 1) Кількість продукту на добу. Прийmemo кількість робочих трудоднів ($T_{рд}$) 300, тоді кількість продукту на добу (V_d) становитиме:

$V_d = V_{кр} / T_{рд} = 1142857 / 300 = 3809 \text{ л / добу.} = 3,8 \text{ м}^3 \text{ за добу.}$ Враховуючи втрати при виробництві(приймаємо 15 %) потреба становитиме: $(3,8 \cdot 0,15) + 3,8 = 4,37 \text{ м}^3$.

- 2) Розрахуємо кількість культуральної рідини за один цикл, ($V_{кр}$):

$$V_{крц} = K_1 \cdot V_d \cdot T_{цф} / 24 = (1,1 \cdot 4,37 \cdot 22) / 24 = 4,4 \text{ м}^3 / \text{цикл.}$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера (22 год), що включає час біосинтезу (12 год), та час підготовки ферментера – 10 год. Підготовка ферментатора включає: миття та огляд – 2 год, перевірка на герметичність – 2 год, стерилізація – 2 год, охолодження – 1 год, завантаження середовища – 1,5 год, засів – 0,5 год, відвантаження культуральної рідини – 1 год; K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує ймовірність нестерильних операцій (1,1-1,5).

- 3) Об'єм готового поживного середовища та посівного матеріалу у виробничому ферментері з врахуванням втрат при біосинтезі $E_{ф} = 0,1$ становить:

$$V_{ф} = V_{кр} / (1 - E_{ф}) = 4,4 / (1 - 0,1) = 4,9 \text{ м}^3.$$

- 4) Геометричний об'єм ферментера для отримання $4,9 \text{ м}^3$ культуральної рідини, з коефіцієнтом заповнення 0,6 має становити:

$$V_r = V_{ф} / K_{зап} = 4,9 / 0,6 = 8,2 \text{ м}^3, \text{ найближчий ферментер } 10 \text{ м}^3.$$

Перевіряємо коеф. заповнення: $K_3 = 4,9 / 10 = 0,49$.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які будуть становити

10%. Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{\phi} = \frac{V_{кр}}{1 - E_{\phi}} = \frac{4.4}{1 - 0.1} = 4.9 \text{ м}^3$$

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10% від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{пс1} = \frac{V_{\phi}}{1 + X_{\phi}} = \frac{4.9}{1 + 0.1} = 4.45 \text{ м}^3$$

де X_{ϕ} – доза посівного матеріалу для ферментера (0,1).

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{пмф1} = V_{\phi} - V_{пс1} = 4.9 - 4.45 = 0.45 \text{ м}^3.$$

При вибраному коефіцієнті заповнення ферментера $K_{зф} = 0.6$ його приблизний геометричний об'єм складе:

$$V_{гф} = \frac{V_{\phi}}{K_{зф}} = \frac{0.45}{0.6} = 0.75 \text{ м}^3$$

Знаходимо найближчий за номінальним об'ємом ферментер $V_{нф} = 1 \text{ м}^3$.

Дану кількість посівного матеріалу можна отримати у посівному апараті на 1000 л.

Для одержання 0.45 м^3 інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплєвиносу через колектор які становлять 10%.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{пс3} = \frac{V_{пмф2}}{1 - E_{\phi}} = \frac{0.45 \text{ м}^3}{1 - 0.1} = 0.5 \text{ м}^3$$

Кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{пспа2} = \frac{V_{пс3}}{1 + X_{па}} = \frac{0.5 \text{ м}^3}{1 + 0.1} = 0.45 \text{ м}^3$$

де $X_{па}$ – доза інокуляту для посівного апарату (0,1).

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{пмф3} = V_{пс3} - V_{пспа2} = 0.5 - 0.45 = 0.05 \text{ м}^3 \text{ або } 50 \text{ л.}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати під час культивування у посівному апараті геометричним об'ємом

$$V_{\text{гпаз}} = \frac{V_{\text{пс3}}}{K_{\text{зпа}}} = \frac{0,05}{0,6} = 0,08 \text{ м}^3$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{нпа}} = 100 \text{ л}$

Для одержання 50 л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті крапливиносу через колектор які становлять 10%.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{пс4}} = \frac{V_{\text{пмф3}}}{1 - E_{\text{ф}}} = \frac{50}{1 - 0,1} = 55 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пспа3}} = \frac{V_{\text{пс4}}}{1 + X_{\text{па}}} = \frac{55}{1 + 0,1} = 50 \text{ л}$$

де $X_{\text{па}}$ – доза інокуляту для посівного апарату (0,1).

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{\text{пмф4}} = V_{\text{пс4}} - V_{\text{пспа3}} = 55 - 50 = 5 \text{ л.}$$

Таку кількість інокуляту для засіву посівного апарату можна одержати культивуванням у колбах. Для цього використовують колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 2000 \text{ мл}$ та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{з}} = 0,2$. Кількість середовища на 1 колбу $2000 \cdot 0,2 = 400 \text{ мл}$.

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме

$$N_{\text{колб}} = \frac{V_{\text{пм4}}}{V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}} = \frac{5000}{400} = 12,5 \text{ колб} = 13 \text{ колб.}$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 13 колб.

РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ДОПОМІЖНИХ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА

4.1 Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.

4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера. Для біосинтезу культури дріжджів з метою одержання біомаси доцільно здійснювати глибинне культивування, оскільки такий спосіб характеризується більшою поверхнею для розвитку мікроорганізмів. Перевагами глибинного культивування є ефективніше використання компонентів поживного середовища, можливість вирощування аеробних та анаеробних мікроорганізмів, можливість автоматизації процесу [9].

Серед різновидів глибинного культивування існують періодичний, безперервний і напівбезперервний режими. У нашому випадку варто обрати періодичний спосіб, оскільки за безперервного важко забезпечити асептичні умови, а застосування напівбезперервного способу не доцільно, так як склад поживного середовища не передбачає підживлення [3, 9].

Дані дріжджі-продуценти за типом живлення є хемоорганогетеротрофом, тобто використовують як донор електронів, джерело вуглецю – органічні речовини, а джерело енергії – хімічні реакції. По відношенню до осмотичного тиску є осмоотолерантним. Температурний діапазон оптимальних умов росту *Saccharomyces cerevisiae* складає близько 30-35 ° С. Може рости в межах рН від 4,2 до 5,5; оптимальне значення 4,5-5 [9,10].

По відношенню до кисню аероби та факультативні анаероби тобто потребує кисню для окиснювальних процесів дихання в звичайних умовах, а в умовах без кисню переходить на бродильний тип метаболізму.

					НУХТ БТЕК 05.01.01 ДП ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Бойко В				Розділ 4 Обґрунтування вибору допоміжних стадій виробництва	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Стабніков В П						1	40
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Пирог Т.П.							

Можуть асимілювати і споживати різні моно і дисахариди такі як глюкоза маноза, галактоза, сахароза мальтоза целобіоза, деякі полісахариди полісахаридної такі, як, декстрин, крохмаль(лише в аеробних умовах), може споживати пептон, і інші продукти білкової природи[10,13]. Найбільш вигідним типом культивування буде глибинне з подачею кисню оскільки даний процес легко підтримувати основні параметри культивування, не потребує великих площ для реалізації виробництва та досить підходяще для одноклітинних культур оскільки перемішувачий пристрій не буде загрожувати цілісності клітин

Обґрунтування вибору ферментера. Ферментер для аеробного культивування мікроорганізмів глибинним способом з використанням рідких поживних середовищ – найбільш специфічний апарат мікробіологічного виробництва. Основними вимогами до таких ферментерів є забезпечення в культуральній рідині заданої концентрації розчиненого кисню, відведення вуглекислого газу, створення однорідного поля концентрацій компонентів культуральної рідини, забезпечення тепломасообмінних процесів, які необхідні для росту та розмноження мікроорганізмів [13].

Для забезпечення річної потреби у цільовому продукті потрібен ферментер об'ємом 50 м³. Для наших цілей можемо використовувати ферментер виробництва BIORUS виготовлений на замовлення, призначений для глибинного культивування аеробних мікроорганізмів. Ферментер даного типу буде відрізнятися великою функціональністю та сумісністю з культивуванням мікроорганізмів в періодичному та напівбезперервному режимах. Апарат виконаний з нержавіючої сталі, оснащений перистальтичними насосами для подачі поживного середовища. Оптимальний коефіцієнт заповнення для цього ферментера 0,7. Оснащений всіма необхідними датчиками, які дозволяють здійснювати контроль за температурою, рН, рО₂, піногашенням. Контроль і підтримання заданої температури здійснюється за рахунок подачі води в рубашку для охолодження та циркуляції води через теплообмінник для нагрівання. Робочий діапазон температури – від +8 до +60 °С, швидкості обертання – від 20 до 1000 об./хв. Подача повітря здійснюється через фільтр, що стерилізується; система комплектується кільцевим барботером. Внесення посівного матеріалу

здійснюється через спеціальний порт в полум'ї кільцевої горілки. Наявна стерильна система відбору проб через спеціальний пробовідбірний клапан. Усі частини ферментера піддаються стерилізації для забезпечення максимально асептичних умов. Обираємо ферментер фірми Біотехно на 10000 л [9,14].

4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря

Продуцент доксорубіцину є строгим аеробом, тому для задоволення біологічної потреби мікроорганізму у кисні під час культивування в інокуляторах і ферментері культура повинна аеруватися стерильним повітрям.

У наш час широко застосовується технологічна схема отримання, очищення і стерилізації стисненого повітря, що включає наступні стадії: попередню (грубу) очистку від механічних домішок, стиснення, охолодження, відділення сконденсованих парів води і масла (при поршневих компресорах) та стерилізацію.

Забір атмосферного повітря здійснюється в екологічно чистій зоні, віддаленій від великих промислових підприємств на висоті 20-30 м для забезпечення максимальної якості та чистоти повітря. Атмосферне повітря з повітрязабірника потрапляє в фільтр попередньої очистки.

Фільтри попередньої очистки встановлюють на всмоктувальній лінії перед компресором. Вони очищають повітря від великих часток розміром більше 5 мкм шляхом інерційного осадження. У фільтруючих матеріалах передбачаються великі проміжки між уловлювальними елементами для максимального зниження опору потоку при високій швидкості фільтрації повітря – 1,5-3,0 м/с. Щоб сухі частинки після осадження не виносилися з фільтра, його шари промаслюються [45].

Далі повітря потрапляє в компресор, де відбувається його стиснення до 0,3 МПа. При стисненні повітря нагрівається до температури 100-200 °С, тому його охолоджують до оптимальної температури культивування продуцента у теплообміннику з подальшим відділенням аерозолу, що утворився, у вологовідділювачі [45].

Потім повітря проходить часткову очистку від мікроорганізмів в фільтрі грубої бактеріальної очистки і повністю очищається від мікроорганізмів в фільтрі тонкої бактеріальної очистки. Фільтри грубої очистки призначені для уловлювання основної

маси забруднень, що потрапили в систему після проходження фільтрів попередньої очистки і компресора. В якості фільтруючого матеріалу в них зазвичай використовують скловолокно з волокнами діаметром 6, 12 і 21 мкм. Основний процес стерилізації здійснюють фільтри тонкої очистки. Конструктивно вони схожі на фільтри грубої очистки, але значно менші за розмірами і в них використовуються більш ефективні фільтруючі матеріали, наприклад, лавсан. Ступінь очищення повітря після стерилізації сягає 99,999 % [9,14].

4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Підтримання чистоти на виробництві має надзвичайно велике значення для успішного процесу ферментації, оскільки залишки попереднього культивування та бруд можуть контамінувати культуральну рідину, що призведе до утворення низькоякісної продукції. Тому, особливу увагу слід звернути на вибір мийних та дезінфікуючих засобів для обробки приміщень та обладнання.

Для очистки обладнання, забрудненого обладнання можна застосовувати розчини їдкого натру (каустичної соди) різних концентрацій. Препарат має сильну бактерицидну дію. З підвищенням температури і додаванням невеликої кількості натрію хлориду дезінфікуюча активність препарату підвищується. В основі антимікробної дії лежить зміна рН середовища, дегідратація мікробних клітин .

Для очищення від забруднень приміщення використовують або розчини спиртових миючих засобів, ПАР чи хлорпохідних. Спиртові та хлорпохідні засоби досить токсичні для персоналу, до того ж не має причини у їх застосуванні, оскільки виробництво біотехнологічного спрямування не потребує високої стерильності зовнішніх поверхонь. Обираємо засіб для очищення забруднених поверхонь Dez-3 на основі ПАР з додаванням 15 5 мінеральної кислоти[14].

4.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.

Для стерилізації компонентів поживного середовища їх потрібно поділити на композиції, стерилізація яких буде проводитися в автоклаві великого об'єму, збірниках чи робочих ферментерах[10]

Таблиця 4.1.4

Склад компонентів поживного середовища для промислового культивування

Компонент	Концентрація компонентів, г/л
Меляса	200
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	4,5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4,5
Пантотенова кислота	1,5 мг
pH	4,5

Оскільки pH буде підтримуватися на рівні, що відрізняється від початкового pH середовища тож необхідним буде підготовка титрувальних розчинів кислоти та лугу для встановлення його на даному рівні та подальшої підтримки.

На основі складу поживного середовища складаємо композиції для стерилізації :

Композиція А: Меляса , режим стерилізації: 121°C протягом 20 хв)[8]. Склад композиції пояснюється необхідністю окремої стерилізації меляси від солей через процес освітлення з додаванням сульфатної кислоти. Що може спровокувати випадіння фосфорних солей у осад. Інозитол входить до даної композиції пояснюється його поганою розчинністю у воді(від 0, 17 до 0,2 г на літр при 25-30 °C), що робить неможливим приготування з нього концентрованих розчинів, тим паче він є досить термостійкий і витримує температуру стерилізації і це зменшить кількість допоміжних ємностей[9]

Композиція Б : $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, режим стерилізації: 131°C, 30 хв)[9]. Склад композиції ґрунтується більш жорсткими умовами стерилізації, які здатні витримати солі, (підкислення буде сильним, буде нерозтворимим осадок)а також

відсутністю взаємодії між компонентами цієї композиції і наявністю у попередній композиції солей у реакції з якими може випасти осад(сульфати і фосфати) [28].

Композиція В: Пантотенова кислота (режим стерилізації 121 °С протягом 20 хвилин). Склад композиції та режим стерилізації пояснюється хорошою розчинністю пантотенової кислоти і можливістю приготування концентрованого розчину, досить малою її кількістю, що передбачає внесення певної кількості концентрованого розчину перед початком культивування у поживне середовище, та досить високою термостійкістю даної речовини, що дозволяє їй витримувати температуру стерилізації[9].

При можливості пониження рН до 4,5 у розчині можливо об'єднати **Композиції А і Б у Композицію А** з режимом стерилізації 121°С на 20 хвилин.

Для зменшення кількості стерилізаційного обладнання композиція з солями буде стерилізуватися у робочому ферментері.

Приготування розчинів титрантів та піногасника.

Оскільки технологічний процес передбачає використання технології підтримки рН та технологію освітлення м'яса необхідним є приготування розчинів титрантів за допомогою яких дані технології реалізуються: гідроксиду натрію та соляної кислоти для його підтримки під час технологічного процесу. Також титранти необхідні для пониження рН при стерилізації компонентів композиції з солями. Концентрації титрантів приймаємо відповідно 6 %. Додавання піногасника також є необхідним оскільки середовище культивування містить піноутворюючі агенти[10].

РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання

Специфікація обладнання наведеного на технологічній схемі розписана у таблиці 5.1.

Таблиця 5.1

					НУХТ БТЕК 05.01.01 ДП ПЗ									
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата										
Розроб.		Бойко В			РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання				Літ.		Арк.		Акрушів	
Перевір.		Стабніков В П									1		46	
Реценз.									Кафедра БТМ					
Н. Контр.														
Затверд.		Пирог Т.П.												

Специфікація обладнання для апаратурної схеми виробничого біосинтезу та допоміжних робіт при одержанні дріжджової біомаси .

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика(виробник)
1	2	3	4
Р-1,Р-2,	Реактор-змішувач для приготування розчину для миття обладнання для	2	Реактор змішувач фірми «НПОФастовський Завод Химического Машиностроения типу «СРЕН» об'ємом 6,3 м ³ оснащений мішалкою та рубашкою [46].
Р-3, Р-4	Реактори для приготування розчинів титрантів	2	Реактор змішувач фірми «НПОФастовський Завод Химического Машиностроения типу «СРЕН» об'ємом 0,063 м ³ оснащений мішалкою та рубашкою [46].
ПЗ-5	Повітрязабірник	1	Повітрязабірник радиальный Dunar CM 21,4[47]
Ф-6	Фільтр грубої очистки	1	Фильт для сжатого воздуха з акрилового волокна WHFIT 030 525PP част до 3 мкм E=90% продукт 315 м ³ /год «ТОВ OMEGA Air» [47]
К-7	Компресор	1	Компрессор GX 7фірми Atlas Copco, потужн 14 л/с, робоч тиск 1 МПа[47]
Т-8	Теплообмінник охолоджувач	1	Теплообмінник-охолоджувач серії AFR 11 «Уралкомпресормаш»[47]
РЕ-9	Ресивер	1	Ресивер РВ 320/10 «Уралкомпресормаш» [47]
Т-10	Теплообмінник -нагрівач	1	Теплообмінник ВОП_N Airone(Росія)[47]
Ф-11	Фільтр тонкої очистки	1	Фильт для сжатого воздуха з боросилікатного волокна WHFIT 030 525PM част до 0.1 мкм E= 99,99 % продукт 315 м ³ /год «ТОВ OMEGA Air» [47]
Н-12,Н-13, Н-14,	Насоси відцентрові	4	Насос відцентровий потужністю 2700-20000 л/год фірми ТОВ «Ватерпасс» [48]
ФІ-15	Ферментер-інокулятор	1	Інокулятор обладнаний базовою системою функцій для ведення напіваавтоматичного та автоматизованого технологічного процесу на 100 л «БИОТЕХНО» [49]
ПА-16	Посівний апарат	1	Фермнетер обладнаний системою функцій для ведення

			напівавтоматичного та автоматизованого технологічного процесу на 1000 л «БИОТЕХНО» [50]
ФРВ-17	Ферментер виробничий	1	Ферментер об'ємом 10000 л обладнаний системою багатофункціонального культивування аеробних мікроорганізмів фірми Біотехно.[51]
Р-,18 Р-19. Р-20	Реактори для приготування композицій поживного середовища для виробничого ферментера та для приготування розчину для підживлення	3	Реактор змішувач фірми «НПОФастовський Завод Химического Машиностроения» типу «СРЕН» об'ємом 6,3 м ³ оснащений мішалкою та рубашкою [46].
Р-,21 Р-22.	Реактори для приготування композицій поживного середовища ферментера-посівного апарата на 1000 л	2	Реактор змішувач фірми «НПОФастовський Завод Химического Машиностроения» типу «СРЕН» об'ємом 500 л оснащений мішалкою та рубашкою [46].
Р-,23 Р-24.	Реактори для приготування композицій поживного середовища ферментера-інокулятора на 100 л	2	Реактор змішувач фірми «НПОФастовський Завод Химического Машиностроения» типу «СРЕН» об'ємом 50 л оснащений мішалкою та рубашкою [46].
ФІ-31 ФІ-32 ФІ-33	Фільтри індивідуальної очистки	3	Фільтр для стисненого повітря воздуха з боросилікатного волокна WHFIT 030 525PS част до 0,01 мкм продукт 315 м ³ /год «ТОВ OMEGA Air», E=99,9999 [51]
Д-33,Д-34 Д-35,Д-36...Д-45	Дозатори об'ємно вагові	4	Дозатор фірми «АСВІК ЦЕНТР» ДВП-6 [52]
Р-30	Реактор для зберігання меляси	1	Реактор-збірник фірми «НПОФастовський Завод Химического Машиностроения» типу «СРЕН» об'ємом 630 л оснащений мішалкою та рубашкою [46].

РОЗДІЛ 6

Опис технологічної схеми для біосинтезу цільового продукту

Технологічна схема біосинтезу біомаси включає допоміжні роботи (скорочено «ДР», що включає підготовку і стерилізацію поживних середовищ) та технологічний процес (скорочення «ТП» , що включає підготовку посівного матеріалу і біосинтез біомаси з використанням штаму *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1530). А також технологічну схему, що наведена в додатку.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва та персоналу.

ДР1.1 Підготовка мийних та дезінфікувальних засобів

Для дезінфекції та миття поверхонь приміщення використовують 2% розчин хлорного вапна.

ДР 1.1.1. Приготування 2% розчину хлорного вапна

У реактор для приготування мийних розчинів Р-1 об'ємом 6300 л вносять відважену певну кількість хлорного вапна і доливають певну кількість питної води, вмикають перемішуючий пристрій та одержують робочий розчин хлорного вапна готовий до застосування.

ДР 1.1.2. Приготування робочого розчину засобу Біомой для миття та дезінфекції обладнання.

Для миття та дезінфекції обладнання необхідно половина об'ємів цього обладнання робочого розчину у даному випадку засобу Біомой. У реактор на 6300 л (Р-2) вносять певну кількість концентрату біомой та певну кількість води питної.

ДР 1.2 Підготовка виробничих приміщень

					НУХТ БТЕК 05.01.01 ДП ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бойко В			Розділ 6 Опис технологічної схеми для біосинтезу	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Стабніков В П					1	49
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

ДР1.2.1 Генеральне прибирання

Генеральне прибирання проводиться 1 раз на місяць (для класичної мийки витрата робочого розчину хлорного вапна становить не менше ніж 100 мл на квадратний метр, а на генеральне затрачається у два рази більше.

ДР1.2.2 Щоденне прибирання

Щоденне прибирання. Мийка здійснюється способом протирання поверхні з використанням 2 % розчину хлорного вапна (від ДР 1.1.1). мийка проводиться 1 раз на добу.

Перед початком роботи персонал повинен пройти санітарно-гігієнічну підготовку, а саме миття рук туалетним або господарським милом та дезінфікацію 76%-им етиловим спиртом. Також обов'язковим є наявність медичного халату та шапочки.

ДР1.3 Підготовка обладнання

ДР1.3.1 Миття обладнання

Миття та обладнання буде проводитися вручну . Мийка проводиться мийно-дезінфекційним засобом «Біомой» (його робочим розчином). Кількість 0,3% робочого розчину(від ДР2.2.1). Температура миття 70-80 °С

Кількість даного робочого розчину становить половину від об'ємів ємнісного обладнання. Це становить 60 л.

ДР1.3.2 Технічний огляд обладнання

Обладнання проходить такі етапи: Загальний *технічний огляд, перевірка на герметичність, пробний пуск, настройка параметрів*

Технічний огляд апаратури проводять після миття та перед запуском процесу аби виявити наявність чи присутність дефектів у ній.

ДР1.3.3Перевірка на герметичність.

Дана стадія стосується в першу чергу основного ферментера , інокулятора. Для цього у апарат на якому герметично затягнута вся арматура подається аераційне повітря до набору надлишкового тиску у 0,1-0,2-МПа, Перекривають прохід повітря, та фіксують показання манометра на протязі 40-60 хв. Якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа – апарат є герметичним. Якщо дане значення перепаду тиску перевищує 0,01 МПа проводять перевірку і знаходять місце розгерметизації методом

омилення апарата(його опорних з'єднання), оскільки ферментер є невеликого об'єму, а цей метод є дуже простим і дешевим.

Апарат і місця з'єднань деталей апарата мильним розчином , для цього на ферментер та місця з'єднань наносять мильний розчин та чекають певний час, у місцях розгерметизації виникають невеликі бульбашки години, операція триває 30-40 хв. При знаходженні місця розгерметизації затягують з'єднальну арматуру. І повторюють операцію, якщо це не дало результатів то міняють прокладки з'єднань

ДР1.3.4 Стерилізація.

Стерилізація проводиться подачею гострої пари у апарат за температури 135 °С, упродовж 1 години.

ДР 1.4. Підготовка персоналу

Перед початком роботи персонал повинен пройти навчання, атестацію та санітарно-гігієнічну підготовку, а саме миття рук туалетним або господарським милом та дезінфікацію 70%-им етиловим спиртом. Також обов'язковим є наявність медичного халату та шапочки.

ДР 2 Підготовка аераційного повітря

ДР2.1 Забір атмосферного повітря

Для підготовки повітря його забирають через повітрезабірну шахту висотою 30 м (ПЗ-5)

ДР2.2 Очищення від грубих часток та пилу

Повітря подається на фільтри грубої очистки де звільняється від великих часточок(ступ. очищення 80 %) на фільтрі грубої очистки Е= 80%) (Ф-6)

ДР2.3 Стиснення повітря

Повітря під дією компресора К-7 стискається і нагрівається до температури 120-250. °С

ДР2.4 Охолодження і видалення вологи

Далі повітря подається на переохолодження для видалення вологи на краплевловлювач (Т-8) де охолоджується до температури 25-30 °С. після воно подається на ресивер.

ДР2.5 Нагрівання повітря

Повітря нагрівається до температури 37⁰С після переохолодження на теплообміннику.

ДР2.6 Фільтрування на фільтрах високої очистки

Повітря піддається високій очистці на фільтрах другого і третього ступенів очистки. Матеріал мікроскловолокно та фторопласт(Ф-9).

ДР 2.7 Фільтрування на фільтрах індивідуальної очистки перед ферментерами.

Перед ферментером повітря проходить через його індивідуальний фільтр(обираємо фторопластові фільтри де повітря очищається на 99,999 %(ФІ-14,15)

ДР 3. Приготування та стерилізація допоміжних розчинів

ДР 3.1. Приготування та стерилізація розчину HCl

У збірник об'ємом 63 л (Р-3) вносять 23,63 л питної води і 4,17 л 36 % соляної кислоти, перемішують отримують 139 л 6 % хлорної кислоти. Стерилізують в при температурі 131 °С 30 хв.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація розчину NaOH

На технічних вагах зважують 1,65 кг гідроксиду натрію, засипають у збірник на 63(Р-4) л та додають 26,1 л питної води. Стерилізують в при температурі 131 °С 30 хв.

ДР 3.3 Приготування і стерилізація композиції В(розчину пантотенової кислоти)

Для стадій вирощування посівного матеріалу буде потрібно 5000 л середовища. Кількість пантотенової кислоти відповідно на таку кількість розчинів ПС буде: $(5000 \cdot 1,5) / 1000 = 83,2$ г. Для точного дозування розчину обираємо концентрацію 1 мг/мл

На технічних вагах зважують 7,5 г пантотенової кислоти.

Наважку переносять у колбу на 10 л , додають 7,5 л води, ставлять на перемішують до повного розчинення. Після цього стерилізують при температурі 121 °С протягом 20 хвилин.

ДР 3.4 Освітлення меляси.

У реакційну ємність л набирають відміряну кількість меляси . Вмикають перемішуючий пристрій, нагрівають ємність з мелясою до 50-60 °С та подають 15 % готовий розчин сульфатної кислоти . рН контролюють за допомогою рН метра, після встановлення рН на рівні 4,0-4,5 подачу кислоти припиняють та витримують упродовж 10-15 хв до повного випадіння осаду сульфату кальція. Далі мелясу відфільтровують на НУТЧ-фільтрі та перекачують у ємність для зберігання на 6000 л.

ДР 3.5 Приготування і стерилізація розчину для підживлення.

Через об'ємно-ваговий дозатор з ємності для зберігання меляси відважують необхідну кількість освітленої меляси. Поміщають у збірник-реактор на 6,3 м³ , (Р-20) додають воду у кількості 1:1 л , перемішують вмиканням мішалки, стерилізують при температурі 121 °С упродовж 20 хв.

ДР 3.6 Підготовка і стерилізація піногасника .

На технічних вагах відміряють 2,776 кг піногасника SILFOAM® SD 670, далі розливають у 3 ємності або скляні хімічні флакони по 5 л. У кожен флакон по 1,6 л. Ємності закривають і стерилізують за допомогою електротену при температурі 131 °С 30 хвилин.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 4.1 Приготування і стерилізація 5000 мл поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках.

Для вирощування інокуляту необхідно приготувати мл поживного середовища (10 % від об'єму середовища стадії 1). Джерелом вуглецю в середовищі є глюкоза, джерелом азоту – амоній хлорид, які входять до складу середовища. Вміст компонентів для приготування 2500 мл середовища наведено в(табл.4.1), середовище для підготовки інокуляту не відрізняється від виробничого.

Таблиця 4.1

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 5000 мл середовища.

Компоненти поживного середовища	Концентрація компонентів г/л	Кількість компонентів поживного середовища на 5000 мл, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Меляса	80	400	А	4200
(NH ₄) ₂ HPO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄	7,5 7,5	22,5 22,5	Б	792
Пантотенова кислота	1,5 мг	7,5 мг	В	7,5 мл

ДР 4.1.1 Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 400 г меляси. Наважку поміщають у колбу об'ємом 5 л, додають спочатку воду у кількості 1900 мл. Перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 121 °С упродовж 20 хв.

ДР 4.1.2 Приготування і стерилізація композиції Б

Зважують на технічних вагах 22,5 г діамоній гідрофосфату і 22,5 г амоній сульфату. Потім переміщують у колбу об'ємом 2000 мл, добавляють 792 мл питної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 30 хв.

ДР 4.2 Приготування і стерилізація 50 л поживного середовища для одержання посівного матеріалу у інокулятор об'ємом 100 л.

Таблиця 4.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 50 л середовища

Компоненти поживного середовища	Концентрація компонентів г/л	Кількість компонентів поживного середовища на 50 л, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Меляса	80	3552	А	22,6
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4,5	200	Б	17,8
(NH ₄) ₂ SO ₄	4,5	200		
Пантотенова кислота	1,5 мг	66,6 мг	В	66,6 мл

ДР 4.2.1 Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 3552 г меляси. Наважку поміщають у реактор на 50 л, (Р-23) додають воду у кількості 9,6 л та перемішують до повного розчинення. Закривають реактор і стерилізують в при температурі 121 °С упродовж 20 хв.

ДР 4.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 200 г дигідрофосфату амонію, та 200 г сульфату амонію. Наважки переносять до реактора на 50 л, (Р-24) додають 17,8 л води та перемішують до повного розчинення. Розчин перекачують до ферментера –інокулятора місткістю 100 л. Закривають запірну арматуру і стерилізують при температурі 121 °С упродовж 20 хв.

ДР 4.3 Приготування і стерилізація поживного середовища об'ємом 450 л одержання посівного матеріалу у ферментері об'ємом 1000 л.

Таблиця 4.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 450 л середовища

Компоненти поживного середовища	Концентрація компонентів г/л	Кількість компонентів поживного середовища на 450 л, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Меляса	80	36000	А	270
(NH ₄) ₂ HPO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄	4,5 4,5	2025 2025	Б	180
Пантотенова кислота	1,5 мг	675 мг	В	675 мл

ДР 4.3.1 Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 36000 г меляси. Наважку поміщають у реактор на 500 л (Р-21), додають воду у кількості 270 л та перемішують до повного розчинення. Закривають реактор і стерилізують в при температурі 121 °С упродовж 20 хв.

ДР 4.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 2025 г дигідрофосфату амонію, та 2025 г сульфату амонію. Наважки переносять до реактора на 500 л, додають 180 л води та перемішують до повного розчинення. Розчин перекачують до ферментера –інокулятора місткістю 1000 л. Закривають запірну арматуру і стерилізують при температурі 121 °С упродовж 20 хв.

ДР 4.4 Приготування і стерилізація 4400 л поживного середовища виробничого культивування у ферментері 10 м³.

Таблиця 4.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 4000 л середовища

Компоненти поживного середовища	Концентрація компонентів г/л	Кількість компонентів поживного середовища на 4000 л, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
Меляса	80	320	А	2400
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4,5	18	Б	1600
(NH ₄) ₂ SO ₄	4,5	18		
Пантотенова кислота	1,5 мг	6000 мг	В	6,7 л

ДР4.4.1 Приготування і стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор відважують 320 кг меляси. Наважку поміщають у реактор на 6,3 м³ (Р-20) л, додають воду у кількості 960 л та перемішують до повного розчинення. Закривають реактор і стерилізують в при температурі 121 °С упродовж 20 хв.

ДР 4.4.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 18 кг дигідрофосфату амонію, та 18 кг сульфату амонію. Наважки переносять до реактора на 6,3 м³ (Р-21) додають 1600 л води та перемішують до повного розчинення. Розчин перекачують до виробничого ферментера місткістю 10 м³. Закривають запірну арматуру і стерилізують при температурі 121 °С упродовж 20 хв.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1 Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1530 зберігають у вигляді ліофілізованої пористої структури у захисному середовищі, оскільки штам є селекційно виділеним і може мати властивість до реверсії ознак. До того ж цей спосіб зберігання не потребує додаткових агрегатів чи машин для зберігання (наприклад холодильних установок) і до того ж культура зберігає всі свої властивості при довгих термінах зберігання.

ТП 5.2 Одержання робочої культури на агаризованих середовищах.

Колекційну культуру відновлюють, в пробірках з середовищем Сусло-агар, потім розсівають мікробіологічною голкою до ізолюваних колоній на чашки Петрі і вирощують при температурі 30-31 °C упродовж 48 годин.

ТП 5.3 Вирощування культури на агаризованих середовищах

Отримані ізолювані колонії (від ТП 3.2) пересівають в пробірки зі скошеним агаризованим середовищем СА (одна ізолювана колонія використовується для засіву однієї пробірки). В пробірки пересівають ізолювані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Тривалість вирощування – 24 год, температура 30 °C[12].

ТП 5.4 Вирощування культури в колбах на качалках

Для вирощування посівного матеріалу у засівну колбу об'ємом 10 л додають додержуючись асептичних умов весь об'єм композиції А (від ДР 4.1.1) та композиції Б (від ДР 4.1.2) та піпеткою у асептичних вносять стерильний розчин пантотенової кислоти (від ДР 3.3). Перемішують і розливають по 400 мл в 12 стерильних качалочних колб Ейлермаєра об'ємом 2000 мл. Туди вносять посівний матеріал з пробірок з сусло-агаром засіяних продуцентом раніше. Операцію проводять

в асептичних умовах. Параметри культивування : температура 30 °С, тривалість – 12 години [10].

ТП 5.5 Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 100 л

У інокулятор, місткістю 100 л зі стерильною композицією Б додають стерильну композицію в асептичних умовах, через засівну колби: композиція А(ДР 2.2.1) та, композицію В(ДР 2.2.3). Потім додають всю кількість посівного матеріалу (з 12 колб на качалках), зі стадії вирощування на качалках(ТП 5.4) через засівну колбу в асептичних умовах, вносять стерильний розчин піногасника (від ДР 3.6) і починають процес культивування.

Параметри культивування : рН-4,5 (встановлюють та підтримують розчином соляної кислоти чи гідроксиду натрія (Від ДР3.2, ДР 3.1)), температура 30 °С, тривалість -12 години, посилена аерація.

ТП 5.6 Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 1000 л

У посівний апарат об'ємом 1000 л, який містить стерильну композицію Б вносять в асептичних умовах стерильні композиції: композицію В(ДР 3.3) та композицію А(ДР 4.3.1). Потім подають 50 л посівного матеріалу через трубу перетиснення, встановлену через нижній штуцер ферментера з попередньої стадії(100 л). Вносять стерильний розчин піногасника (від ДР 3.6)Починають процес культивування.

Параметри культивування : рН-4,5 (встановлюють та підтримують розчином соляної кислоти чи гідроксиду натрія (Від ДР3.2, ДР 3.1)) температура 30 °С, тривалість 12 години , посилена аерація

ТП 6. Біосинтез

ТП 6.1 Виробничий біосинтез

Виробниче культивування здійснюють у ферментері з робочим об'ємом 10 м³ , який містить стерильну композицію Б вносять в асептичних умовах стерильні композиції: композицію В(ДР 3.3) та композицію А(ДР 4.4.1). Потім подають 500 л посівного матеріалу через трубу перетиснення, встановлену через нижній штуцер ферментера з попередньої стадії(1000 л). Вносять стерильний розчин піногасника (від ДР 3.6)Починають процес культивування.

Починають процес культивування. Під час процесу культивування підтримують концентрацію розчиненого кисню (pO_2) на рівні 40 %. (від насичення повітрям). Технологія культивування така: стартове поживне середовище, що містить 80 г/л меляси засівають культурою посівного матеріалу, виставляють вище зазначені параметри і культивують протягом 6 годин. Починаючи з 6 години порційно в асептичних умовах вносять стерильний розчин для підживлення у кількості 900 л кожні 3 години до кінця сумарного часу культивування у 12. Вирощують культуру до кінця експоненційної фази росту.

pH підтримується на рівні 4,5 розчинами гідроксиду натрія та соляної кислоти (ДР 3.1, ДР 3.2), температура культивування становить 30 °C . Кожні 2-4 годин відбирають проби для аналізу процесу ферментації(концентрації біомаси, кількість вуглецю і азоту у культуральній рідині. Процес ферментації орієнтовно триває 12 годин, остаточну зупинку процесу здійснюють при досягненні максимальної концентрації біомаси 35 г/л.

РОЗДІЛ 7 Контроль виробництва

Упродовж виробничого культивування періодично (кожні 2-4 год) відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси, а також вмісту джерела вуглецю (у мелясі це сахароза) і азоту (амонійний азот). З ферментера відбирається проба об'ємом 200-500 мл, що потім розподіляється по всім методам контролю.

7.1 Карта постадійного контролю.

Наводимо карту постадійного контролю виробництва для кращого орієнтування у стадіях виробництва.

					НУХТ БТЕК 05.01.01 ДП ПЗ									
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата										
Розроб.		Бойко В			Вступ				Літ.		Арк.		Акрушів	
Перевір.		Стабніков В П									1		61	
Реценз.									Кафедра БТМ					
Н. Контр.														
Затверд.		Пирог Т.П.												

Таблиця 7.1

Карта постадійного контролю виробництва

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кх, 1.1.1 Приготування розчину хлорного вапна	Концентрація розчину хлорного вапна	Хімічний метод	Після приготування розчину	$C=2\%$
Кх, 1.1.2 Приготування розчину засобу Біомой	Концентрація розчину засобу Біомой	Хімічний метод	Після приготування розчину	$C=0,3\%$
Кт 1.2.1 Підготовка виробничих приміщень	Підлога, стіни, обладнання, чистота	Візуальний огляд	Після прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду

Кт 1.3.1 Миття розбірних частин обладнання	Розбірні частини обладнання, мийний розчин, його температура, чистота	Термометр технічний	Під час проведення операції	$T = 45^{\circ}\text{C}$
Кт 1.3.2 Миття обладнання	Мийний розчин для обладнання, температура мийного розчину, чистота	Термометр технічний, годинник	Під час проведення операції	$T = 45^{\circ}\text{C}$ t- 1-2 год
Кт 1.3.3 Перевірка на герметичність	Герметичність роботи обладнання, час роботи, тиск	Манометр технічний, годинник	Тис визначається безперервно під час виконання операції	t- 0,5 год $P = 0.07\text{мПа}$

Кт 1.2.8	Очищене	Перевірка	Під час	E= 99,99%
Кт 1.3.4 Стерилізація обладнання	Обладнання, температура стерилізації, час	Термометр, годинник	Температура визначається безперервно під час виконання операції	t- 0,5 год T=135 ⁰ С
Кт 2.2.2 Грубе очищення повітря	Повітря на виході з фільтрів грубої очистки, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорта фільтра	Після очистки повітря на фільтрі грубої очистки	E= 80
Кт 2.2.3 Компресування повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр технічний	Після компресування повітря	P= 0,35-0,5 МПа, t= 220-250 ⁰ С
Кт 2.2.4 Охолодження повітря	Охолоджене повітря, температура	термометр технічний	Після охолодження повітря	t= 25-40 ⁰ С
Кт 2.2.5 Видалення зайвої вологи	Повітря після видалення вологи	Психрометричний метод	Після видалення зайвої вологи	W=60%
Кт 2.2.6 Нагрівання повітря	Нагріте повітря, температура	термометр технічний	Після нагрівання повітря	t= 37 ⁰ С
Кт 2.2.7 Тонке очищення повітря	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорта фільтра	Після очищення повітря у фільтрі тонкої очистки	E= 99%

Очищення повітря на індивідуальному фільтрі	повітря, ступінь очищення	ступеня очищення згідно паспорта фільтра	очищення повітря у фільтрі	
Кт, Кх 3.1.1 Приготування і стерилізація розчину соляної кислоти	Концентрат соляної кислоти, температура, час, стерильність, концентрація	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль-після	C= 6% T=131 ⁰ C t=40 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Кх 3.1.2 Приготування і стерилізація розчину гідроксиду натрію	Сухий гідроксид натрію, температура, час, стерильність, концентрація	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль-після	C= 6% T=131 ⁰ C t=40 хв відсутність мікробіоти
Кт, Кх 3.1.3 Приготування і стерилізація розчину пантотенової кислоти	Концентрація, пантотенової кислоти, температура, час, стерильність, концентрація	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль-після	C= 1 мг/мл T=121 ⁰ C t=20 хв відсутність мікробіоти
Кт, Кх 3.1.4 Освітлення розчину м'яси	Концентрація м'яси, рН	рН-метр, мікробіологічний контроль	рН визначається під час пониження.	C= 1 мг/мл рН= 4,0-4,5
Кт, Кх 3.1.5 Приготування і стерилізація розчину піногасника	Сухий піногасник(концентрат)	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль-після	C= 10% T=121 ⁰ C t=20 хв відсутність мікробіоти
Кт, Кх 3.1.6 Приготування і стерилізація підживлюючого	М'яса освітлена, температура, тривалість,	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний	Температура визначається безперервно під час стерилізації,	C= 50 % T=131 ⁰ C t= 20 хв відсутність

розчину.	мікробіологічний контроль.	й контроль	мікробіологічний контроль-після	мікробіоти
Кт, Км 4.1.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль-після	$T=121^{\circ}\text{C}$ $t=20\text{ хв}$ Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль-після	$T=121^{\circ}\text{C}$ $t=20\text{ хв}$ Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль-після	$T=121^{\circ}\text{C}$ $t=20\text{ хв}$ Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль-після	$T=121^{\circ}\text{C}$ $t=20\text{ хв}$ Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль-після	$T=121^{\circ}\text{C}$ $t=20\text{ хв}$ Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.2 Приготування і	Композиція Б, температура,	Термометр технічний,	Температура визначається	$T=121^{\circ}\text{C}$

стерилізація композиції Б	час, стерильність.	годинник, мікробіологічний контроль	безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	t=20 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А , температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	T=121 °C t=20 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б , температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	T=121 °C t=20 хв Відсутність мікробіоти

1	2	3	4	5
Кт, Км 3.4 Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль	Після вирощування культури в колбах на качалках	$T=30^{\circ}\text{C}$ $t=12$ год $\text{pH}=4,5$ Відсутність сторонньої мікробіоти, аерація
Кт, Км, Кх 3.5 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 50 л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, рН-метр мікробіологічний контроль	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі	$\text{pH}=4,5$ $T=30^{\circ}\text{C}$ $t=12$ год Відсутність сторонньої мікробіоти, аерація
Кт, Км, Кх 3.6 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 500 л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, рН-метр мікробіологічний контроль	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі	$\text{pH}=4,5$ $T=30^{\circ}\text{C}$ $t=12$ год Відсутність сторонньої мікробіоти, аерація
Кт, Км, Кх 3.7 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 5000 л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування	Термометр технічний, годинник, тахометр, рН-метр мікробіологічний контроль	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі	$\text{pH}=4,5$ $T=30^{\circ}\text{C}$ $t=12$ год Відсутність сторонньої мікробіоти, аерація

	, чистота культури			
Кт, Км, Кх 6.1 Виробничий біосинтез у ферментері на 5000 л	Культуральна рідина, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, чистота культури, концентрація біомаси виражена	Термометр технічний, годинник, тахометр, рН-метр мікробіологічний контроль, фотоколориметричний метод визначення концентрації біомаси.	Під час вирощування культури в ферментері, відбір проб: кожні 2-4 годин	pH=4,5 T=30 ⁰ C t=12 год Відсутність сторонньої мікробіоти, Аерація 40 % від насичення повітрям, підживлення кожні 3 години починаючи з 6 години по 900 л підживлюючого розчину.

7.2 Мікробіологічний контроль

Здійснюється розсівом на чашки Петрі з агаризованими середовищами і мікроскопуванням. Культуральну рідину розсівають до ізольованих колоній на чашки Петрі з використанням середовища Сабуро для виявлення грибів та дріжджів, та середовище МПА для виявлення бактерій. В основному роблять розсів на МПА оскільки основні сторонні культури можуть становити бактерії. Проте паралельно роблять мікроскопію і розсів на чашки Петрі з середовищем Сабуро для виявлення відсутності сторонніх видів дріжджів. Для мікроскопування використовують препарати «роздавлена крапля». Препарат «роздавлена крапля» готують на знежиреному предметному склі, на яке наносять маленьку краплю культуральної рідини, накривають накривним скельцем і розглядають з об'єктивом 40х, або з імерсійною системою на $\times 90$. При оцінці морфолого-культуральних ознак продуцента перш за все звертають увагу, на характерні особливості колоній продуцента (рис 7.2.1).



Рисунок 7.2.1 *Saccharomyces cerevisiae* на агаризованих поживних середовищах[53].

Опис колонії має наступний вигляд: колонії круглясті, білого або світло-білого кольору, при старінні клір стає насичений.

Готують препарат роздавлена крапля для мікроскопії: з проби мікробіологічною петлею забирають трохи суспензії культуральної рідини, потім вносять краплю фіз-розчину, на предметному скельні, далі петлею перемішують і накривають предметним скельце. Мікроскопіюють при збільшенні 40 та при 90 з імерсійним маслом

(рис 7.2.2).

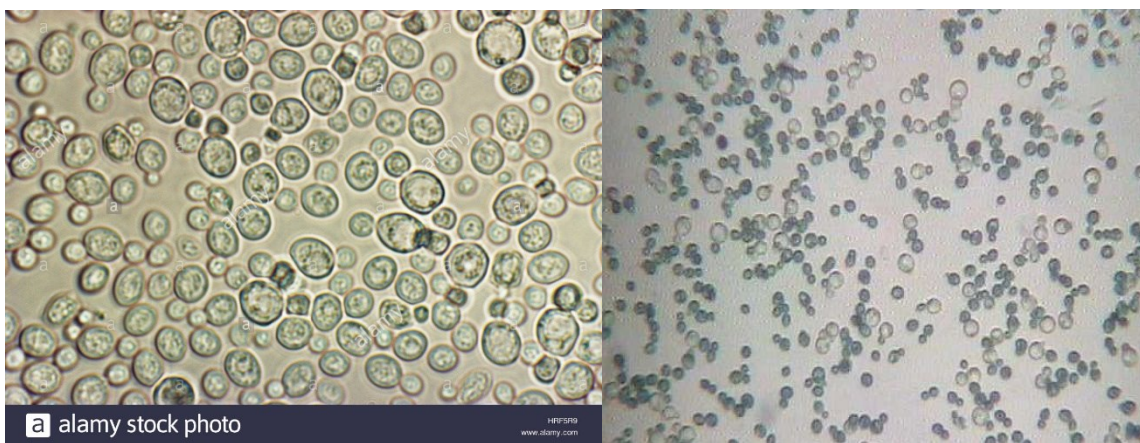


Рис 5.2.2 Мікроскопія *Saccharomyces cerevisiae* під збільшенням x90 та x40[54].

Контроль стерильності поживного середовища.

Пробу поживного середовища або окремої композиції у кількості 10 мл розводять у мірній колбі у 100 разів використовуючи стерильну воду та стерильну мірну колбу на 1 л. Після чого в асептичних умовах відбирають 0,1 мл одержаного розчину та висівають на чашки Петрі суцільним газоном на 2 типи середовищ: МПА та «Сабуро» для виявлення бактерій та грибів+дріжджів відповідно. Культивують чашки Петрі з середовищем МПА 24 години при 37 °С а з «Сабуро» 72 години при 30 °С.

7.3 Показники росту і синтезу цільового продукту.

7.3.1 Концентрація біомаси .

Непрямий метод (Метод з використанням ФЕК :

Концентрацію біомаси у г/л культуральної рідини визначають за допомогою фотоелектроколориметра(ФЕК), а саме за різницею оптичної густини D клітинної суспензії та еталонного зразка і переводять відповідне значення оптичної густини за допомогою калібрувального графіка у грами.

Концентрацію біомаси визначають за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на кількість грамів на літр за допомогою калібрувального графіка відносно еталонного зразка.

Для цього у пробірки вносимо 9 мл дистильованої води і 1мл культуральної рідини. Кількість розведень становить 5-6 разів. Суміш перемішують при кожному розведенні. Після останнього розведення вимірюють оптичну густину на фотоелектроколориметрі (при довжині хвилі 540 нм) у кюветі товщиною 10 мм. Для більш точного визначення вимір проводять три рази поспіль і знаходять середнє значення. Те саме роблять з контрольним зразком який представляє собою розведене в стільки ж разів свіже поживне середовище для культивування. Після цього одержані значення оптичної густини віднімають і отримують різницю. За допомогою калібрувального графіка переводять це число у концентрацію біомаси в одиниці г/л[55].

7.3.2 Концентрація джерела вуглецю і азоту

Визначення концентрації джерела азоту. Джерелом азоту в середовищі є амонійний азот з солей. Для визначення даного джерела азоту найбільше підходить метод Несслера.

Метод Несслера базується на утворенні забарвленої важкорозчинної сполуки при взаємодії реактиву Несслера (K_2HgI_4) з аміаком в нейтральних або лужних розчинах: $2HgI_4 + NH_3 + OH = NH_2Hg_2I_3 + 5I_2 + H_2O$ [4]. Великого надлишку лугу слід уникати, оскільки може відбутися розкладання $NH_2Hg_2I_3$ з утворенням оксиду

ртуті. Забарвлена сполука $\text{NH}_2\text{Hg}_2\text{I}_3$ схильна до утворення негативно заряджених колоїдних частинок. Для отримання рівномірної і стійкої суспензії в розчин вводять захисний колоїд – желатин, полівініловий спирт. При малих концентраціях аміаку колоїдні розчини мають жовте забарвлення, при збільшенні концентрації з'являється бурий відтінок. Отримання в ході аналізу колоїдних розчинів, здатних до коагуляції, знижує відтворюваність результатів аналізу, одержуваних методом Несслера. Для визначення аміаку до 1 мл супернатантукультуральної рідини додають 1 мл реактиву Несслера. Коефіцієнт екстинції вимірюють при довжині хвилі 400–425 нм. Концентрацію аміаку визначають за калібрувальним графіком. Фотометричному визначенню азоту методом Несслера заважають іони, що випадають в осад у лужному середовищі і утворюють нерозчинні сполуки з йодид-іонами та іонами ртуті (магній, марганець, залізо, титан, сульфід-іони та ін.)[47].

Визначення концентрації джерела вуглецю.

Визначення масової частки сахарози в поживному середовищі буде здійснюватися за методами з використанням поляриметричних трубок різної довжини.

Перед початком визначення розчин з проби освітлюють.. Як освітлювач в використовують в основному ацетат свинцю, що є розчином основної солі складу $2\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2$, який отримують при розчиненні свинцевого глету PbO в розчині оцтовосвинцевої солі $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, взятих в еквімолекулярних кількостях.

Ацетат свинцю освітлює розчин, осаджуючи кислоти: щавелеву кислоту, оксикислоти, білки, сапоніни, барвні речовини, пектинові речовини, продукти розкладу редукувальних речовин, меланоїдини.

Як дуже сильний освітлювач (під час аналізів утфелюостанької кристалізації та меляси) застосовують основний нітрат свинцю, який утворюється з двох розчинів: Герлес I і Герлес II. Компоненти цих розчинів – $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ і NaOH зберігаються окремо. Використовують кожного реагенту по 7-10 cm^3 . Для освітлення в розчин

меляси додають в 3-4 прийоми рівними частинами: спочатку додають 2-3 см³ розчину нітрату свинцю, а після перемішування – 2-3 см³ розчину ідкого натру.

Концентрації розчинів Герлес I і Герлес II підбирають так, щоб утворився основний ацетат свинцю

Масову частку сахарози визначають масовим та об'ємним методами. Беруть досліджуваний розчин, вимірюють температуру. У разі, якщо температура не відповідає 20 °С, розчин підігрівають на водяній бані. Потім досліджуваний розчин заливають у поляриметричні кювети на 100, 200 і 400 мм. У поляриметричній кімнаті при цілковитій темряві виставляється нуль прилада, потім опускаємо поляриметричну трубку в кювету відділення поляриметра і вимірюємо вміст сахарози. По нижній шкалі будуть цілі числа, по верхній визначаються десяті долі вмісту сахарози.

Результати визначень розраховують за формулою де 0,26 – ціна поділки поляриметра, г; P_{200} – покази шкали поляриметра в поляриметричній трубці на 200 мм; 26 – нормальна наважка продукту, 2.

Масову частку сахарози, %, обчислюють за формулою

$$C_x = \frac{0,26 \cdot P_{200} \cdot 100}{n} \%,$$

Одержані результати подвоюють, 400 мм – ділять на 2.

Список використаної літератури:

1. Швед О . В, О. Б. Миколів О. Б, В . О, Комаровська. В . О, Порохнявець, О . З , Новіков. В . П Екологічна біотехнологія //Навчальний посібник. –2-е вид. –Львів: Львівська політехніка –2010.–368 с.
- 2.Любова О.В.,Пилипчук О.О.Конспект лекцій «Сільськогосподарська біотехнологія»– Київ, 2014. – 83 с
- 3.Хлібопекарські дріжджі. [Електронний ресурс]. Режим доступу : http://beaplanet.ru/gribi/dryzhdzhy/hlybopekarsky_dryzhdzhy.html
4. Виробництво пивних дріжджів [Електронний ресурс].Режим доступу http://prombiotech.kpi.ua/materials/Atestroboty2015/Bakalavr2017/Terzi_A_Y.PDF
6. Савченко О.М., Челябієва В.М, Сиза О.І.// Розробка технологічних основ для підвищенні підйомної сили хлібопекарських дріжджів //Технічні науки, технології продовольчих товарів -2014- Том 5 - . N 95 Ст 1–20.
7. Електронний ресурс].Режим доступу: www.vito-house.com.ua/catalog/drozhdzhi_pressovannye_100_gr_lvov/
8. Електронний ресурс].Режим доступу: <http://delgusto.ua/ua/product-l-vovskie-drozhdzhi-1-kg-pressovannye>
9. Пирог.Т.П , Ігнатова О.А Загальна біотехнологія:- К : НУХТ, 2009 – ст 25-99.
10. Pat. US 2012/0128853 A1.Methodofproductionbreak`syeast//Salan M.A, Alhassa S.A; Siddig H. H., ; Fahad .M. A. – 24.05.2012
11. Пат. UA 6 C12N1/00. Штам дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* для одержання сушених хлібопекарських дріжджів.
12. Claire .M. H, LoveridgeIain S. D.Diane, Kelly .S .L // Co-productionofbioethanolandprobioticyeastbiomassfromagriculturalfeedstock: applicationoftheruralbiorefineryconcept//Hulletal. AMB Express jornal.-2014-. Vol 4 - . N 64 P 1–8.
- 13.Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підручник. – К.: НУХТ, 2004. – ст: 102-354.

14. Технологія мікробного синтезу лікарських засобів: Метод. Рекомендації до викон. курс. роботи для студ. Напрямку 6.051401 «Біотехнологія» ден. форм. навч. / Уклад.: *Т. П. Пирог, Ю.М Пенчук*. – К.: НУХТ, 2011. – ст 17-19.
15. Глюкоза [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://kodkh.com/p721054688-glyukoza-pisch.html>
16. Пептон.[Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.systopt.com.ua/pepton-fermentatyvnyj/>
17. Дріжджовий автолізат [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://russian.alibaba.com/product-detail/best-price-yeast-extract-60761737505.html?spm=a2700.8699010.normalList.22.5f9974bdgwTfEz>
18. Меляса [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://prom.ua/p712341577-patoka-tonny;wholesale.html>
19. Амоній гідрофосфат [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://prom.ua/p528979183-diammonijfosfat-diammofos-gidrofosfat;wholesale.html>
20. Амоній сульфат [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://prom.ua/p76935892-sulfat-ammoniya.html>
21. Сульфат магнія [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://prom.ua/p850374591-sulfat-magniya-magnij.html>
22. Інозитол [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://prom.ua/p621819737-inozit-inozitol-mezoinozit;wholesale.html>
23. Пантотенова кислота [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://russian.alibaba.com/product-detail/top-quality-vitamin-b5-pantothenic-acid-powder-60402429312.html?spm=a2700.8699010.normalList.7.38726a28Jm9Rqo&s=p>
24. Біореактор на 50 м³ [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://ecolabmicrotex.ru/shop/solida-biotech/sip-cip-promyshlennye-bioreaktory-500l-50m3/>
25. Данилов.І.П , Самойленко С.І Апарати мікробіологічної промисловості: - Харків : НТУ «ХПІ», 2008 – ст 40-50.

26. Біореактор на 50 м³ [Електронний ресурс] – Режим доступу <http://ecolabmicrotex.ru/shop/solida-biotech/sip-cip-promyshlennye-bioreaktory-500l-50m3/>
27. Піногасинк силікатний [Електронний ресурс] – Режим доступу <https://prom.ua/ua/p40714266-silfoam-670-silikonovyj.html>
28. Інозитол фіз-хім властивості [Електронний ресурс] – Режим доступу <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/892#section=Boiling-Point>
29. Пантотенова кислота фіз-хім властивості [Електронний ресурс] – Режим доступу <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/988#section=Experimental-Properties>
30. [Електронний ресурс] – Режим доступу https://www.google.com.ua/search?q=saccharomyces+cerevisiae&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjX5bPqhZXhAhXj-SoKHYJID9oQ_AUIDigB&biw=1280&bih=907#imgrc=ilbuIPZ-DiGdKM:
- 31.[Електронний ресурс] – Режим доступу https://www.google.com.ua/search?q=saccharomyces+cerevisiae&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjX5bPqhZXhAhXj-SoKHYJID9oQ_AUIDigB&biw=1280&bih=907#imgrc=CvGwpBznL5CIIM:
32. [Електронний ресурс] <https://studfiles.net/preview/5194349/page:18/>
33. Загальні технології харчової промисловості: Лабораторний практикум для студентів напряму підготовки 6.051701 «Харчові технології та інженерія» за освітньо-кваліфікаційним рівнем «бакалавр» денної форми навчання / Уклад.: С.П. Олянська, О.В. Грабовська, О.М. Молодницька – К.: НУХТ, 2014. – ст 15-20.
34. Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.mdpi.com/2306-5710/2/4/30>
35. Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://uk.wikipedia.org/wiki/Дріжджі>
36. Електронний ресурс] – Режим доступу: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Saccharomyces_cerevisiae
37. Електронний ресурс] – Режим доступу: https://www.uwyo.edu/virtual_edge/lab13/fungi_results.htm

38. Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://archive.fieldmuseum.org/myconet/outline.asp#classSacc>
39. .Електронний ресурс[Режим доступу]: http://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?sce00010
40. .Електронний ресурс[Режим доступу]:. http://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?sce00061
41. Електронний ресурс[Режим доступу] http://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?sce00250
42. Електронний ресурс[Режим доступу] www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?sce00051
43. [Електронний ресурс]. Режим доступу : <https://www.unian.ua/economics/agro/10739127-v-ukrajini-skorotilosya-virobnictvo-hliba-de-i-skilki-spekli.html>
44. [Електронний ресурс]. Режим доступу : <https://buklib.net/books/24469/>
- 45.. *Савченко О.М., Челябієва В.М, Сиза О.І.*// Розробка технологічних основ для підвищенні підйомної сили хлібопекарських дріжджів //Технічні науки, технології продовольчих товарів -2014- Том 5 - . N 95 Ст 1–20.
46. Реактори типа «СРЕН» , интернет магазин: [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://pwg.in.ua/>
47. Основи проектування біотехнологічних виробництв: Метод. Рекомендації до викон. курс. роботи для студ. Напрямку 6.051401 «Біотехнологія» ден. форм. навч. / Уклад.: Т. П. Пирог, Ю.В Карлаш, В.О Красінько . – К.: НУХТ, 2015. – 10 – 19 с.
48. Ферментер. Електронний ресурс: [режим доступу] : <https://bio-rus.ru/primeryi-speczifikaczij/?page=2>
49. Насос перистатичний Електронний ресурс: [режим доступу] : https://vaterpass.com.ua/catalog/peristalticheskie_nasosyi/seriya_psf/rotho_psf1
50. Ферментер виробничий Електронний ресурс: [режим доступу] : <https://biotechno.ru/>
51. Фільтри для стисненого повітря. Електронний ресурс: [режим доступу] : <https://www.omega-air.com.ua/filtr-szhatogo-vozduha-whfit-seriya>
52. Дозатори об'ємно-вагові: Електронний ресурс: [режим доступу] <https://asvik.kiev.ua/ua/catalog/group/product/29>

53. [Електронний ресурс] – Режим доступу

https://www.google.com.ua/search?q=saccharomyces+cerevisiae&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjX5bPqhZXhAhXj-SoKHYJID9oQ_AUIDigB&biw=1280&bih=907#imgsrc=ilbuIPZ-DiGdKM:

54.[Електронний ресурс] – Режим доступу

https://www.google.com.ua/search?q=saccharomyces+cerevisiae&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjX5bPqhZXhAhXj-SoKHYJID9oQ_AUIDigB&biw=1280&bih=907#imgsrc=CvGwpBznL5CIIM:

55. [Електронний ресурс] <https://studfiles.net/preview/5194349/page:18/>

56. Загальні технології харчової промисловості: Лабораторний практикум для студентів напряму підготовки 6.051701 «Харчові технології та інженерія» за освітньо-кваліфікаційним рівнем «бакалавр» денної форми навчання / Уклад.: *С.П. Олянська, О.В. Грабовська, О.М. Молодницька* – К.: НУХТ, 2014. – ст 15-20.

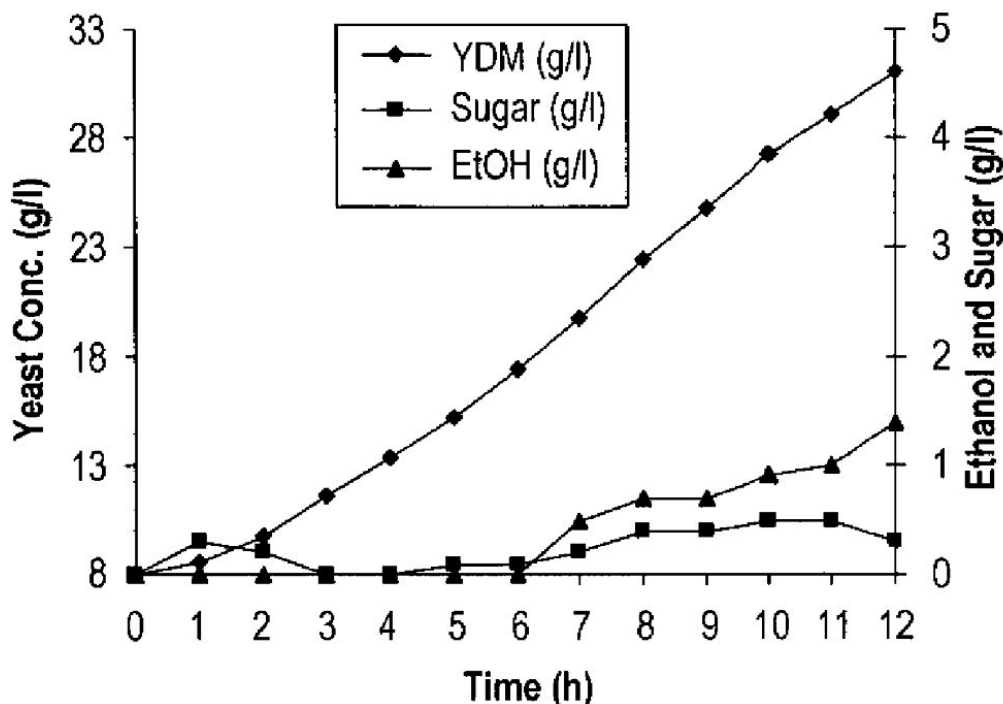
Додаток 1.



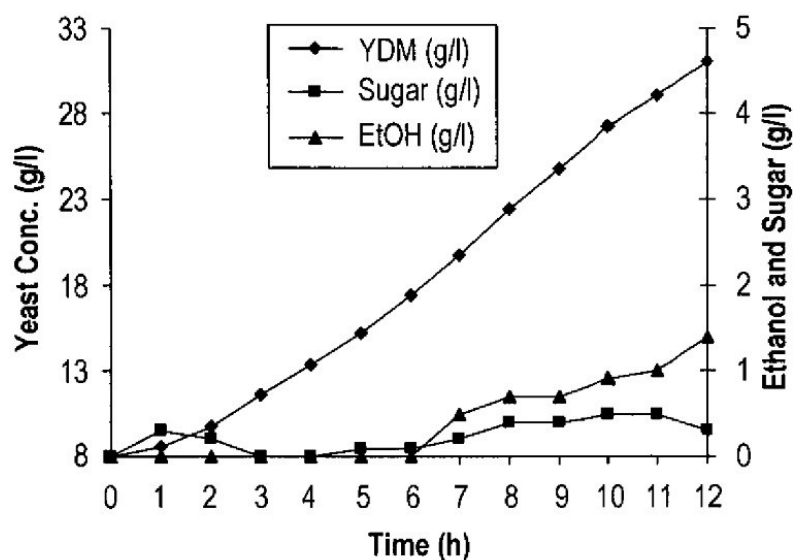
US 20120128853A1

(19) **United States**(12) **Patent Application Publication**
ALEID et al.(10) **Pub. No.: US 2012/0128853 A1**
(43) **Pub. Date: May 24, 2012**(54) **METHOD OF PRODUCING BAKER'S YEAST**(52) **U.S. Cl. 426/549; 435/255.2**(76) **Inventors:** **SALAH MOHAMMED ALEID,**
Alhassa (SA); **Siddig Hussein**
Hamad, Alhassa (SA); **Fahad**
Mohammed Al-Jasass, Riyadh
(SA)(57) **ABSTRACT**

The method of producing baker's yeast involves producing yeast from a substrate composed of date syrup (Dips) diluted by molasses in sufficient quantity to lower the concentration of organic acids present in the date syrup that are toxic to yeast to safe levels, preferably a 1:1 mixture (w/w) of date syrup (Dips) and molasses. The substrate is inoculated with viable cells of *Saccharomyces cerevisiae* yeast and placed in a bioreactor or fermentation vessel. The yeast is produced by a fed-batch process to ensure continuous yeast production and prevent or minimize the production of alcohol by the yeast, additional increments of the substrate being added about hourly for the duration (about 12 hours) of the yeast propagation process. The process produces baker's yeast comparable in quality to yeast produced from a pure molasses substrate for such purposes as making bread, and in sufficient quantity to be practical for industrial production.

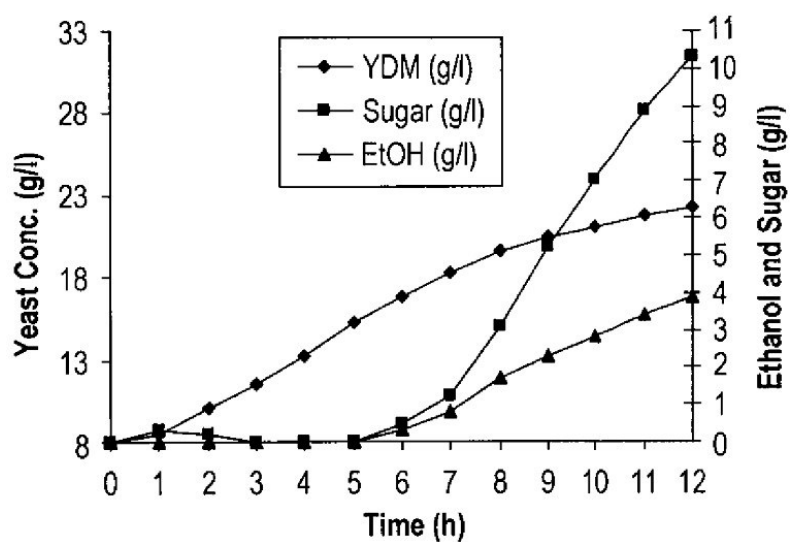
(21) **Appl. No.: 12/954,534**(22) **Filed: Nov. 24, 2010****Publication Classification**(51) **Int. Cl.**
C12N 1/18 (2006.01)
A21D 13/00 (2006.01)

**Propagation of *S. cerevisiae* NCYC 1530
on Molasses Substrate**



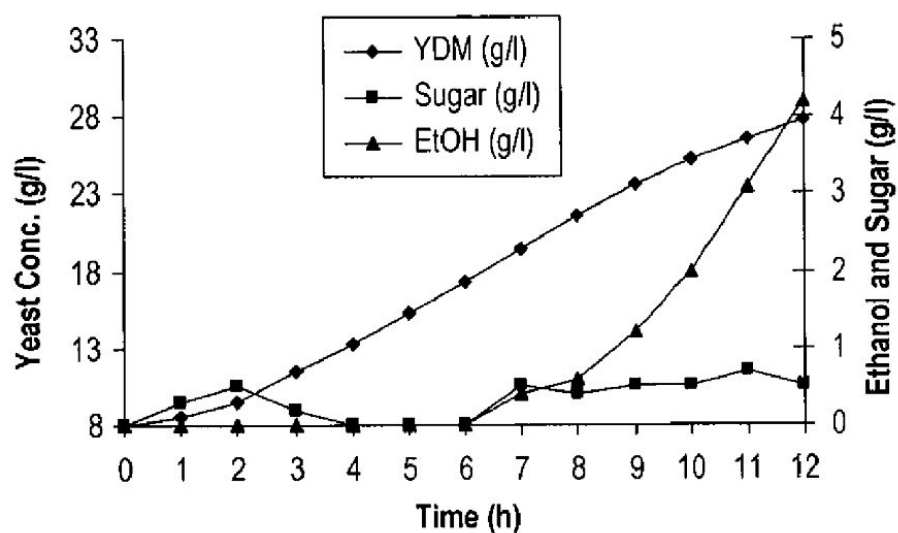
Propagation of *S. cerevisiae* NCYC 1530
on Molasses Substrate

Fig. 1



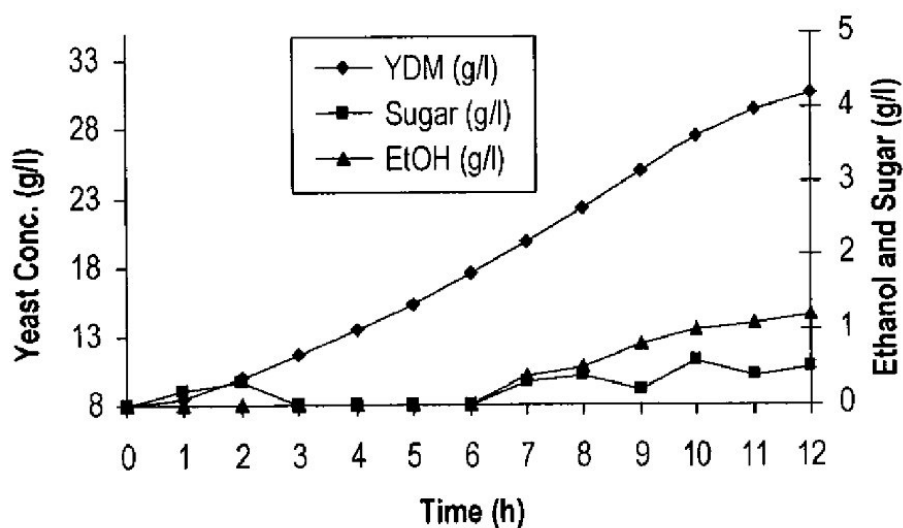
Propagation of *S. cerevisiae* NCYC 1530
on Dips Substrate

Fig. 2



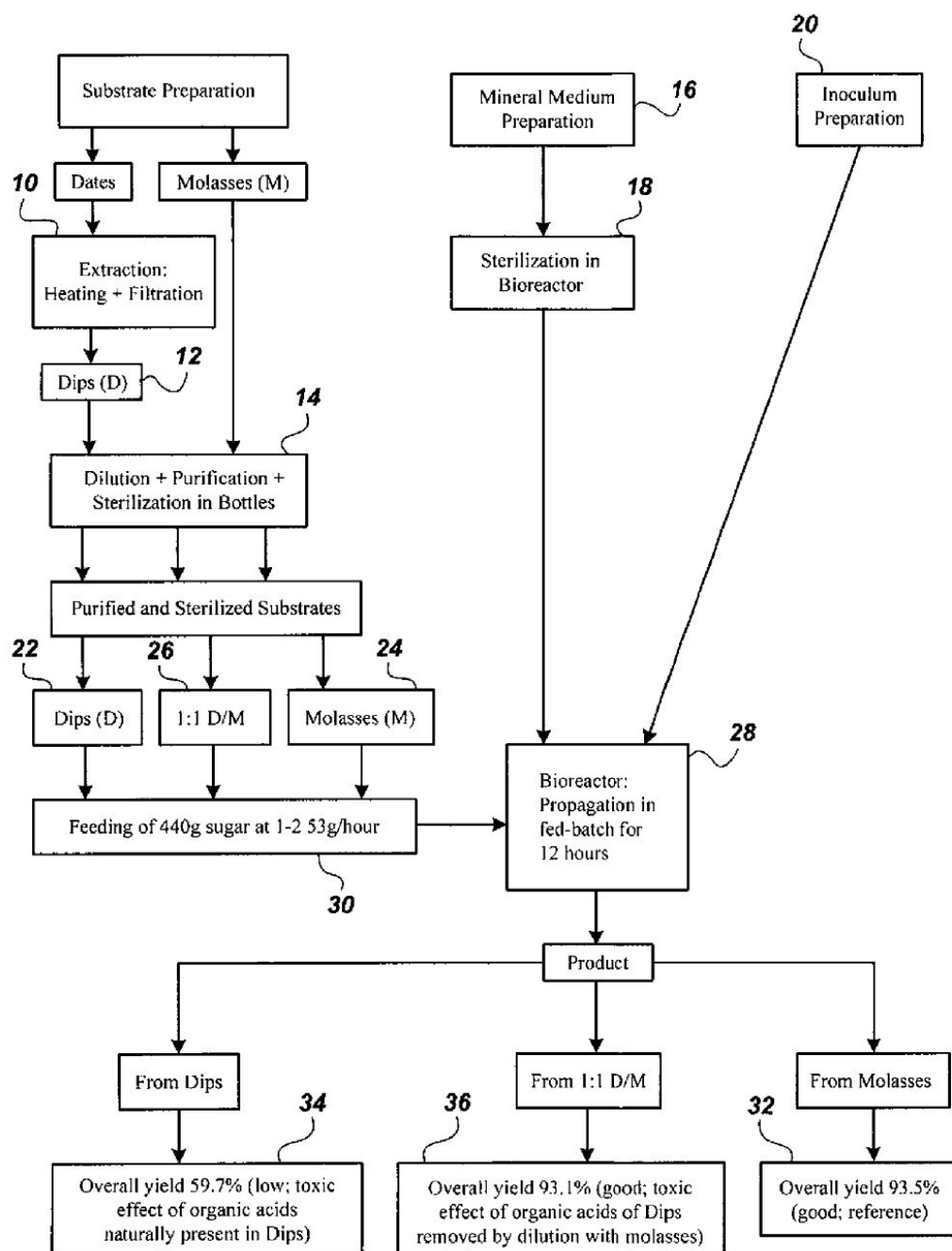
Propagation of *S. cerevisiae* NCYC 1530
on 2:1 Dips/Molasses Substrate

Fig. 3



Propagation of *S. cerevisiae* NCYC 1530
on 1:1 Dips/Molasses Substrate

Fig. 4

**Fig. 5**

METHOD OF PRODUCING BAKER'S YEAST

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0001] 1. Field of the Invention

[0002] The present invention relates to fermentation processes and processes for the production of yeast, and particularly to a method of producing baker's yeast that uses date syrup as part of the substrate.

[0003] 2. Description of the Related Art

[0004] The economic utilization of dates is a very important issue to the Kingdom of Saudi Arabia because this crop is the most important agricultural produce of the country. The date crop is also the historical staple in the whole area, having a very high religious and cultural significance, which makes the continuation of its production at the highest possible levels a national priority. Thus, Saudi Arabia is one of the major date producers in the world, with an annual production of about one million tons of date fruits. About 50% of this amount is consumed locally as human food, 4% exported and 4% used as animal feed. More than 40% of the annual produce, i.e., about 400 thousand tons, mainly fruits of the low quality Rezez variety, represents a surplus for which there is currently no economic use. Rezez is produced in large quantities because the tree can grow in marginal soils without much need for fertilization, but still gives high yields of fruits.

[0005] Baker's yeast is a type of yeast used in the production of leavened bread, cakes, pastries, and other bakery products. Baker's yeast converts the fermentable sugars in dough into carbon dioxide and ethanol. The most common strain of yeast in baker's yeast is *Saccharomyces cerevisiae*, which is also used in fermentation processes for the production of alcoholic beverages. Baker's yeast may be processed so that it is available to the user in a variety of forms, including dry yeast (which may be in cakes or in granules) and liquid yeast, and in active or dehydrated forms.

[0006] Baker's yeast can be produced from substrates that contain metabolizable sources of carbon, energy, nitrogen, minerals and essential vitamins. Substrates that contain carbon and energy sources readily metabolizable for *Saccharomyces cerevisiae* can be directly used for production of baker's yeast, while those containing complex carbohydrates, such as starches in grains and cellulose in green or woody plants, need costly hydrolytic treatment before use. The substrate of choice for baker's yeast production in the world today is molasses derived from beets or sugar cane.

[0007] Saudi Arabia imports all of its local market needs for baker's yeast, which amounts to about 10 thousand tons per year. A factory for the production of baker's yeast that was based in the city of Jeddah, in the west of the country, stopped production, partly due to the high cost of imported molasses substrate. Thus, the high cost of the raw materials for the production of baker's yeast has caused Saudi Arabia and many other Gulf Coast countries to rely upon importation of baker's yeast to meet demand.

[0008] Commercial baker's yeasts produced from strains of *Saccharomyces cerevisiae* have the following average chemical composition: 47% C, 32% O₂, 6% H₂, 7.7% N₂, 2% K, 1.2% P, 1% S, 0.2% Mg, 0.1% Na, and other trace elements. In addition, the yeast cells contain small amounts of vitamin B complex, of which D-Pantothenic acid, D-Biotin and m-Inositol are essential because the yeast cells cannot synthesize them. These elements and compounds must be provided in the production medium in enough quantities and metabolizable forms.

[0009] Dates are known to contain a variety of simple sugars, and may contain 65-87% sugars, 1-3% proteins, in addition to many minerals important for yeast nutrition, including potassium, magnesium, sulphur, phosphorus, iron, calcium, and chlorine. Although various laboratory studies have suggested that it may be theoretically possible to use portions of or extracts from dates as a substrate for the production of baker's yeast, it has not been practical to do so industrially because it has not been shown that the process is economically efficient, i.e., the biomass of yeast produced from a given mass of substrate has not been high enough or efficient enough to justify the expenditure in raw materials for the substrate and nutrients, the labor, the capital equipment, and other costs for production, transport, and delivery to the consumer. It has been reported that the optimum biomass concentration in the fermentation medium for economical production is about 40 g/l, which existing methods and processes have not come close to.

[0010] Thus, a method of producing baker's yeast solving the aforementioned problems is desired.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0011] The method of producing baker's yeast involves producing yeast from a substrate composed of date syrup diluted by molasses in sufficient quantity to lower the concentration of organic acids present in the date syrup that are toxic to yeast to safe levels, preferably a 1:1 mixture (w/w) of date syrup (Dips) and molasses. The substrate is inoculated with viable cells of *Saccharomyces cerevisiae* yeast and placed in a bioreactor or fermentation vessel. The yeast is produced by a fed-batch process to ensure continuous yeast production and prevent or minimize the production of alcohol by the yeast, additional increments of the substrate being added about hourly for the duration (about 12 hours) of the yeast propagation process. The process produces baker's yeast comparable in quality to yeast produced from a pure molasses substrate for such purposes as making bread, and in sufficient quantity to be practical for industrial production of baker's yeast.

[0012] These and other features of the present invention will become readily apparent upon further review of the following specification and drawings.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0013] FIG. 1 is a graph showing the relative concentrations of yeast (YDM), sugar, and ethanol (EtOH) as a function of time when the yeast is propagated on a substrate of molasses.

[0014] FIG. 2 is a graph showing the relative concentrations of yeast (YDM), sugar, and ethanol (EtOH) as a function of time when the yeast is propagated on a substrate of date syrup (Dips).

[0015] FIG. 3 is a graph showing the relative concentrations of yeast (YDM), sugar, and ethanol (EtOH) as a function of time when the yeast is propagated on a substrate of 2:1 date syrup (Dips)/molasses.

[0016] FIG. 4 is a graph showing the relative concentrations of yeast (YDM), sugar, and ethanol (EtOH) as a function of time when the yeast is propagated on a substrate of 1:1 date syrup (Dips)/molasses.

[0017] FIG. 5 is a flowchart schematically illustrating a method of producing baker's yeast according to the present invention.

[0018] Similar reference characters denote corresponding features consistently throughout the attached drawings.

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

[0019] The method of producing baker's yeast involves producing yeast from a substrate composed of date syrup (Dips) diluted by molasses in sufficient quantity to lower the concentration of organic acids present in the date syrup that are toxic to yeast to safe levels, preferably a 1:1 mixture (w/w) of date syrup (Dips) and molasses. The substrate is inoculated with viable cells of *Saccharomyces cerevisiae* yeast and placed in a bioreactor or fermentation vessel. The yeast is produced by a fed-batch process to ensure continuous yeast production and prevent or minimize the production of alcohol by the yeast, additional increments of the substrate being added about hourly for the duration (about 12 hours) of the yeast propagation process. The process produces baker's yeast comparable in quality to yeast produced from a pure molasses substrate for such purposes as making bread, and in sufficient quantity to be practical for industrial production of baker's yeast.

[0020] Date syrup was chemically analyzed to determine its contents for comparison to nutrients needed by baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), and also to determine the presence of chemicals that could be toxic to the yeast. The results presented in Table 1 show that date syrup contained about 80% total sugars, i.e., 800 kg/ton, mainly in the form of fructose (41%), and glucose (38%), and a small amount of sucrose (1%). It also contained 2% crude protein, 1.13 g/kg phosphorus, 14.88 g/kg potassium, 0.79 g/kg magnesium, 240 ppm pantothenic acid, 2.73 ppm biotin, and no detectable amounts of m-Inositol.

[0021] These results indicate that date syrup can be used as a main source of carbon and energy for baker's yeast production. Calculations based on the chemical composition of date syrup shown in Table 1 give the following. Since a ton of date syrup contains 800 kg sugar, then this ton, regarded as a carbon and energy source, should produce about 400 kg dry yeast, because one kg sugar is known to yield about 0.5 kg yeast dry matter, i.e., we need about 2.5 kg of date syrup for every kilogram of yeast dry matter produced. The protein content of date syrup is about 2%, i.e., 20 g/kg, whereas baker's yeast contains about 50% proteins, i.e., 500 g/kg yeast dry matter. This means that one kg yeast (i.e., 500 g protein) contains about 80 g nitrogen (16% nitrogen in protein), and the nitrogen content in 2.5 kg date syrup available to produce one kg yeast (see above) is about 8 g of nitrogen. Hence, there is a deficiency of about 72 g nitrogen for every kg yeast produced. This nitrogen deficiency in date syrup must be covered by adding to the production medium inorganic nitrogen sources, such as ammonium salts. The phosphorus content in date syrup is 1.13 g/kg (about 2.8 g/2.5 kg date syrup), compared to 14.1 g/kg in the yeast; i.e., date syrup is deficient in phosphorus, which has to be added to the production substrate in the form of inorganic phosphorus at about 11.5 g phosphorus for every kg of yeast produced. The magnesium content in date syrup is 0.79 g/kg (about 2 g/2.5 kg Date syrup), and its content in baker's yeast is 2 g/kg, so that the magnesium content in date syrup is just enough. No m-Inositol was detected in date syrup. Thus, about 2 g of this compound must be added to the production medium for every kg of yeast produced. The potassium content of date syrup is about 15 g/kg (37 g/2.5 kg Date syrup), whereas the content of

potassium in yeast is about 20 g/kg yeast dry matter. This means that the potassium content in date syrup is enough for baker's yeast production. Similar calculations show that biotin and pantothenic acid are present in date syrup in quantities sufficient for baker's yeast production.

TABLE 1

Nutrients in date syrup compared to requirements of baker's yeast		
Chemicals	Concentration in date syrup	Content in Baker's yeast
Phosphorus (g/kg)	1.13	14.10
Potassium (g/kg)	14.88	20
Magnesium (g/kg)	0.79	2
Total sugars (%)	80	30
Fructose	41	
Glucose	38	
Sucrose	1	
Crude protein (%)	2	50
Pantothenic acid (ppm)	240	150
Biotin (ppm)	2.73	0.30
m-Inositol (ppm)	0	2000

[0022] To compensate for the deficiencies in nutrients mentioned above, mineral media with compositions as shown in Table 2 were used in our laboratories to try to obtain production of up to 40 g/l yeast dry matter (e.g. 400 g yeast in a 10 liter fermentation volume). The substrates used were pure date syrup and, separately, molasses alone. The molasses substrate gave satisfactory yield, while the yield from pure date syrup was unsatisfactory. The reduced yield from pure date syrup substrate was attributed to the presence of compounds toxic to the yeast in date syrup.

TABLE 2

Composition of mineral media required for 400 g yeast dry matter		
Chemicals	Amount (g)	
	100% molasses	100% date syrup
(NH ₄) ₂ SO ₄	61	60
(NH ₄) ₂ HPO ₄	54	53
Pantothenic acid	0.025	0
m-Inositol	0	0.8

[0023] With regard to its content of nutrients, date syrup can compare very well with molasses, which is the conventional substrate for baker's yeast production world wide, as shown in Table 3. Date syrup contains much more sugar, biotin and pantothenic acid than molasses, about similar content of nitrogen, phosphorus and magnesium, about half the content of potassium (but still enough for baker's yeast production), but much less m-Inositol.

TABLE 3

Nutrient composition of date syrup compared to molasses			
Nutrient	Date syrup	Beet molasses	Cane molasses
Sugars (%)	80	50	50
Nitrogen (%)	0.13	0.5	0.1
Phosphorus (%)	0.11	0.03	0.09
Potassium (%)	1.5	3.0	3.0
Magnesium (%)	0.08	0.01	0.3
Biotin (ppm)	2.73	0.05	2.0

TABLE 3-continued

Nutrient composition of date syrup compared to molasses			
Nutrient	Date syrup	Beet molasses	Cane molasses
Pantothenic acid (ppm)	240	80	25
m-Inositol (ppm)	0	6500	2000

[0024] Compounds toxic to baker's yeast detected in date syrup include formic acid at 3.06%, acetic acid at 2.38%, and propionic acid at 0.68%, (total acids 6.12%), and no detectable amounts of the toxicants nitrite, sulfite and butyric acid (see Table 4). Formic acid becomes toxic to the yeast when its concentration in the medium exceeds 0.25% (w/v), whereas the toxicity level of the other two acids is in excess of 3.0% (w/v) for the sum of the two. In baker's yeast fermentation, a maximum of about 40 g/l yeast dry matter end concentration in the fermentor can be reached. In industrial fermentations this will mean adding date syrup to the mineral medium to an end dilution of 1:10 (Date syrup:medium). Since date syrup is added in a fed-batch process, the concentration of toxic acids will increase gradually to reach about 0.3% for formic acid and about 0.7% for total acids at the end of fermentation (the amount present in date syrup diluted 1:10). This end concentration of formic acid is within levels toxic to baker's yeast. Fermentation experiments done in our laboratories confirmed this, where only 50-60% of the theoretical yields were obtained when pure date syrup was used as substrate.

[0025] In the examples below, the following materials, equipment, and procedures were used.

[0026] Glucose, Fructose, Sucrose and m-Inositol concentrations were determined with High Performance Liquid Chromatography (HPLC) using a Shimadzu Japan Model 2003, equipped with a RID 10A refractive index detector, CLC NH₂ 6x150 column, LC 10ATP pump, and CTO 10AC VP oven. Mobile phase was 83% CH₃CN:17% water (v/v), flow rate 1 ml/min., column pressure 200 KgF/cm². Ethanol was determined enzymatically using the UV-method (Boehringer, Mannheim/R-Biopharm). Biotin and pantothenic acid were determined according to the vitaFast (r-biopharm) vitamin testing method, using ELISA Reader, Multiskan EX Model No. 355, Thermolabsystem-Finlan. Phosphorus, potassium, magnesium, sulfur, and crude protein, were determined according to A.O.A.C. standard methods of analysis (1992). Formic, acetic, propionic and butyric acids were determined using Gas Liquid Chromatography, Column: LiChroCART 125-4, Purospher RP-18 e, 5 µm; mobile phase: A: 20 mM sodium dihydrogen phosphate, pH 2.5; B: Acetonitrile; Detection: UV 220 nm). Yeast biomass was determined using the dry matter method after centrifugation of 5 ml broth at 2000 rpm for 5 minutes in a dry centrifugal tube, and overnight drying at 105° C.

[0027] Date syrup (Dips, an Arabic name) used in the fermentation experiments was obtained from a factory operating in Hofuf City, Saudi Arabia. Its extraction process was as follows: de-pitted fruits (Rezez variety) were heated with equal amount of water at 80° C. for 30 minutes, and then filtered using a filter press and a micro filter (Filtrox AG, CH 9000 St. Gallen, Switzerland), and finally concentrated to 80 Brix at 80° C. under vacuum to give the syrup named Dips. Sugar cane molasses was obtained from the local market. It was a product imported from Egypt.

[0028] The yeast strain used in this study was a *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1530 brought from the laboratories of the National Center for Yeast Collection, Institute of Food Research, Norwich, Great Britain.

[0029] Inoculum size used in all fermentations was 8 g/l. The yeast was first propagated in the bioreactor in fed-batch processes, then filtered to yeast cake, and then kept in the refrigerator for use as inoculum.

[0030] Four substrates were used for propagation, namely, 100% Rezez Dips as the substrate of study, 2:1 and 1:1 Dips/molasses (weight/weight) as a trial to remove deficiencies in Dips alone, and 100% cane molasses as a reference substrate. The substrates were prepared as follows: dilution with water to give sugar concentrations of about 20%, pH brought to 4.5 with H₂SO₄, and then heating to boiling for about 20 minutes. This treatment clarifies the substrate from suspended matter, which is left to precipitate, and the clear supernatant decanted and then sterilized in 5-liter bottles by autoclaving at 121° C. for 30 minutes.

[0031] The mineral medium was formulated after chemical analysis of Rezez Dips and molasses substrates used for propagation and comparison of their nutrient content with the needs of baker's yeasts (Bronn, 1990). For each fermentation run (to produce a maximum of 220 g yeast from 440 g sugar fed to the fermentor), 45 g (NH₄)₂HPO₄ and 45 g (NH₄)₂SO₄ were used as mineral medium, in addition to 15 mg Pantothenic acid for the molasses substrate, and 10 g MgSO₄ and 0.5 g m-Inositol for the Dips substrate (magnesium content of Dips was marginal). No vitamins or magnesium sulfate were added to the mixed substrate. The nutrients were dissolved in 6 liters distilled water in the bioreactor, the pH adjusted to 4.5, and then autoclaved for 30 minutes at 121° C.

[0032] Fermentations were carried out in a BioFlo 110 bioreactor (New Brunswick Scientific, New Jersey, USA) with 10-liter working volume. All runs were fed-batch processes, at 30° C., 8 g/l inoculum size, 6.0 liter starting volume, and sugar concentration in all substrates was 200 g/l. Totals of 440 g sugar (2.2 liter substrate) were pumped into the bioreactor, the feeding starting at 12 g/h sugar, then increased every hour to reach a maximum of 53 g/h in 9 hours, then kept constant till the end of propagation (8.2 liter end volume in the bioreactor). This feeding strategy was supposed to give a maximum of about 35 g/l yeast concentration in the bioreactor, and the growth rate of the yeast should not exceed a critical value of about 0.2 h⁻¹ to avoid respirofermentative growth and formation of ethanol due to the Crabtree Effect common to all *Saccharomyces cerevisiae* strains (the critical growth rate was calculated according to (Bronn, (1990))). Fermentation time was 12 hours and samples were taken every hour for analysis.

[0033] The viable cell counts of the yeast were determined by plating on Potato Dextrose Agar (PDA, Oxoid CM0139) and incubation for 2-4 days at 30° C. The theoretical yield of yeast biomass on sugar (Y_{x/s}) is 0.5 g yeast dry matter per g sugar (Bailey and Ollis, 1986). The actual yields were calculated by dividing yeast biomass produced by the amount of sugar fed to the fermentor.

Example 1

[0034] To try to remove the toxic compounds (the volatile organic acids) from Date syrup, and hence increase yield, the following treatment was applied. A treatment similar to one performed for molasses clarification in baker's yeast factories (for the removal of similar compounds) was performed as

follows. Date syrup was diluted 1:3 with water, pH brought to 4.5 with sulfuric acid, and then it was boiled in an open container under continuous aeration for about 15 minutes. This treatment did not bring about the desirable effect, as can be seen from Table 4. This can be due to the fact that our treatment was performed in a simple pot, while the treatment of molasses is typically done in equipment specially designed for this purpose, with heating up to 140° C. under pressure followed by release of pressure and injection of air, which can result in a more effective evaporation of the volatile toxic compounds. Such equipment is not available to us now, but can be regarded as a possible solution in plants for commercial production.

TABLE 4

Contents of chemicals toxic to baker's yeast in date syrup				
Chemical	Toxicity level (%) in yeast substrate*		Concentration (%) in Date syrup	
	Tolerable	Toxic	Untreated	Treated
Nitrite	<0.001	Up to 0.05	0	0
Sulfite	<0.01	>0.15	0	0
Formic acid	<0.1	>0.25	3.06	2.81
Acetic acid	<1.0	Up to 3.0	2.38	2.38
Propionic acid	<1.0	Up to 3.0	0.68	0.51
Butyric acid	<1.0	Up to 3.0	0	0

[0035] In Table 4, the data in columns two and three relating to the Toxicity Levels in the yeast substrate, both tolerable and toxic, are taken from Bronn, W., "Technology of Baker's Yeast Production" (in German), Technical University of Berlin, Germany (1990).

Example 2

[0036] Since conventional treatment did not eliminate the toxins intrinsic to date syrup, the present inventors decided to try diluting the toxins in date syrup to a tolerable level by adding molasses to the date syrup substrate. Therefore, a comparative experiment was designed using four substrates: pure molasses, pure date syrup, a 1:1 date syrup/molasses dilution, and a 2:1 date syrup/molasses dilution.

[0037] Chemical analysis of Rezez Date syrup and cane molasses used in this study showed that the two substrates contained comparable amounts of nutrients needed by baker's yeast, as shown in Table 5. Both are good sources of carbon and energy, and contain enough amounts of potassium, magnesium and the essential vitamin biotin. The deficient nutrients are nitrogen and phosphorus in both substrates, sulfur and the essential vitamin m-Inositol in date syrup, and the essential vitamin pantothenic acid in molasses.

TABLE 5

Nutrients required to produce 1 kg yeast dry matter					
Nutrient	Content in 2.5 kg of Rezez Date syrup	Content in 3.4 kg of cane molasses	Content in 1 kg of baker's yeast*	Deficiency in Date syrup	Deficiency in molasses
Phosphorus (g)	2.8	3.0	13	10.2	10
Potassium (g)	37.3	102	20	—	—
Magnesium (g)	2	10.2	2	—	—
Sulphur (g)	1.2	17	10.8	9.6	—
Nitrogen (g)	3.2	3.4	80	76.8	76.6

TABLE 5-continued

Nutrients required to produce 1 kg yeast dry matter					
Nutrient	Content in 2.5 kg of Rezez Date syrup	Content in 3.4 kg of cane molasses	Content in 1 kg of baker's yeast*	Deficiency in Date syrup	Deficiency in molasses
Pantothenic acid (mg)	600	91.8	150	—	58.2
Biotin (mg)	6.8	7	0.3	—	—
m-Inositol (g)	0	13.6	2	2	—

[0038] Table 5 represents the contents of various nutrients (as shown by the inventors' chemical analysis) in 2.5 kg of Rezez date syrup and in 3.4 kg of molasses, the contents of the same nutrients in Baker's yeast as provided in the above reference by Bronn, and the calculated deficiency in the date syrup and in the molasses (based upon sugar content, it is estimated that 2.5 kg of the date syrup or 3.4 kg of the molasses are required to produce 1 kg of yeast (*S. cerevisiae*) dry matter).

[0039] Propagation of the yeast on pure date syrup substrate gave much lower overall biomass yields compared to pure molasses substrate (FIGS. 1 and 2). In the first 5 hours of propagation, the yields from the two substrates were similar (Table 6). The overall yields reached in this period were about 0.49 g yeast dry matter per gram of sugar for both substrates, representing 98% of the theoretical yield (total biomass produced was about 51 g yeast dry matter (FIGS. 1 and 2) from 104 g sugar fed). Only traces of sugar and ethanol were detected in the fermentation broth during propagation, indicating that the growth was fully oxidative and no respirofermentative metabolism was taking place. Starting from the sixth hour of propagation, the biomass yields of the yeast grown on date syrup substrate started to decrease, and reached 0.05 g/g in the last hour of propagation, when the growth was respirofermentative, i.e., ethanol was produced. At the end of propagation the maximum yeast biomass concentration reached was 22.2 g/l, 3.9 g/l ethanol was produced, and 10.3 g/l sugar remained unconsumed in the fermentation broth (FIG. 2 and Table 6). The average (from three runs) overall biomass yield on sugar was about 0.3 g yeast dry matter per gram of sugar, representing about 60% of the theory (Table 8).

TABLE 6

Biomass yields of <i>S. cerevisiae</i> NCYC 1530				
Time (h)	Molasses	Date syrup	Date syrup/molasses (2:1)	Date syrup/molasses (1:1)
0	0	0	0	0
1	0.34	0.29	0.29	0.24
2	0.41	0.47	0.33	0.45
3	0.48	0.45	0.46	0.48
4	0.49	0.47	0.47	0.49
5	0.47	0.47	0.47	0.47
6	0.48	0.45	0.46	0.48
7	0.47	0.30	0.41	0.44
8	0.46	0.17	0.36	0.42
9	0.41	0.12	0.30	0.42
10	0.40	0.07	0.23	0.42

TABLE 6-continued

Biomass yields of <i>S. cerevisiae</i> NCYC 1530				
Time (h)	Molasses	Date syrup	Date syrup/molasses (2:1)	Date syrup/molasses (1:1)
11	0.34	0.07	0.18	0.36
12	0.31	0.05	0.15	0.26

[0040] With respect to molasses, the biomass yield remained fairly constant till the eighth hour of propagation, the yeast growing oxidative, and no significant amounts of ethanol were formed or sugar accumulated in the fermentation broth. Starting from the ninth hour, the yields started to decrease and reached 0.31 g/g in the last hour of propagation, and 1.4 g/l ethanol was formed, but still no significant amounts of sugar remained in the broth (FIG. 1 and Table 6). The maximum biomass concentration reached at the end of propagation was 31 g/l, and the average (from three runs) overall yield on sugar from molasses substrate was about 0.47 g/g, representing about 94% of the theoretical yield. The yield from molasses substrate was significantly higher than that from date syrup substrate (Table 8). The decrease in yield from molasses substrate at the end of propagation can be explained by the fact that the biomass concentration reached a critical limit where oxygen supply was not enough to support fully oxidative growth. This was apparent in a drop of the dissolved oxygen concentration in the broth to about zero saturation, even when the stirring rate was raised to about 9000 rpm. According to Bailey and Ollis, "Biochemical engineering fundamentals", second edition. McGraw-Hill Book Company, New York (1986), p. 294, the critical oxygen concentration for oxidative growth of most microorganisms lies in the range 0.1 to 10% of the saturation solubility value of oxygen in water. As a result of a shortage in oxygen supply, the yeast cells seemed to have shifted to respirofermentative metabolism and produced ethanol at the expense of biomass.

[0041] With regard to the yeast grown on date syrup substrate, the conditions were different. No oxygen shortage was observed, since the dissolved oxygen concentration in the broth remained fairly above 10% saturation. The decrease in biomass yield can only be explained by the presence of yeast toxic organic acids, especially formic acid, at high concentrations in Rezez date syrup. The concentration of these acids in the 1:4 diluted date syrup substrate was about 0.75% formic and 0.50% acetic+propionic+butyric acids. No information was found in the literature about the organic acid content of date fruits. The Rezez date syrup used in this work was slightly acidic, with pH about 5. The organic acids of the fruit were concentrated in the date syrup during extraction (4-5 times), and they may have been natural products of the date fruit, or they may have been produced by bacterial contaminants. The concentration of these acids in the fermentation broth increased gradually with time as the substrate feeding to the fermentor proceeded, and reached toxic levels of 0.3 to 0.34% at the end of propagation (Table 7). This explains why the biomass yields were high at the beginning of propagation, where formic acid concentration was low, and then started to drop after a critical concentration of this acid was reached. According to the above-cited Bronn reference, baker's yeasts can tolerate up to 0.1% formic acid and up to 3.0% acetic+propionic+butyric acids, but these acids become toxic at concentrations above 0.25% for formic and above 3% for the

other acids. No significant differences in viable cell counts were found between yeasts produced on date syrup and molasses substrates (Table 8), but the ones produced on date syrup had a much longer lag phase. Well-developed colonies developed in about 2 days of incubation in the case of yeasts from molasses, whereas those from date syrup needed 3 to 4 days to form comparable colonies. This indicates that these organic acids were more fungistatic rather than fungicidal.

TABLE 7

Concentration of organic acids toxic to <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
Concentration (%) in broth at end of propagation		
Substrate	Formic acid	Acetic + propionic + butyric acids
Pure Date syrup	0.3-0.34	0.36-0.41
2:1 Date syrup/molasses	0.17-0.21	0.23-0.25
1:1 Date syrup/molasses	0.11-0.14	0.16-0.20

TABLE 8

Comparison of yields and viable cell counts of <i>S. cerevisiae</i> NCYC 1530		
Substrate	Average yields (% of theoretical)	Viable cell counts (log ₁₀ cfu/g)
Molasses	93.5 ^a	10.38 ^A
Date syrup	59.7 ^c	10.23 ^A
2:1 Date syrup/molasses	80.4 ^b	10.30 ^A
1:1 Date syrup/molasses	93.1 ^a	10.34 ^A

^{a-c}Mean values within the same column bearing different superscripts are significantly different (P ≥ 0.05)

[0042] In order to eliminate Date syrup toxicity by dilution, substrates containing 2:1 and 1:1 Date syrup/molasses (w/w) were used for propagation. The performance of the yeast in the first 5 hours of propagation on both substrates was comparable to that on Date syrup and molasses (FIGS. 3 and 4 and Table 6). The overall biomass yields on sugar from the 2:1 substrate in this phase (calculated from FIGS. 3 and 4 and 104 g sugar fed) was 0.47, and that from the 1:1 substrate was 0.49 g/g, representing 94 and 98% of the theoretical values, respectively. In the rest of the propagation period the yields from the 2:1 substrate decreased more rapidly than those of the 1:1 substrate and reached 0.15 g/g in the last hour of propagation (Table 6). The biomass concentration at the end of propagation with the 2:1 substrate was about 28 g/l, 4.2 g/l ethanol was produced, and only traces of sugar remained unconsumed (FIG. 3). The overall average biomass yield on sugar was about 80% of the theoretical values, which was significantly higher than that from pure date syrup, but still significantly lower than that from molasses (Table 8). The concentration of formic acid in the fermentation broth at the end of propagation was 0.17-0.21 (Table 7). This concentration seemed to have reached the level of toxicity for the yeast production, and hence caused a decrease in the biomass yield. The biomass concentration at the end of propagation with the 1:1 substrate was about 31 g/l, 1.2 g/l ethanol produced, and only traces of sugar remained unconsumed (FIG. 4). The overall average biomass yield on sugar was about 93% of the theoretical value, and was not significantly different from that of molasses (Table 4). The concentration of formic acid in the fermentation broth at the end of propagation was 0.11-0.14 (Table 7). This concentration seemed to be tolerable to the yeast, and hence the biomass yield was not affected. In addi-

tion to the high yield obtained, the 1:1 date syrup/molasses substrate is superior to the other substrates, including molasses, in that it contains enough amounts of the essential vitamins m-Inositol and pantothenic acid that cover the needs of the yeast, and hence no addition to the medium is required.

[0043] FIG. 5 schematically summarizes the process and results achieved. The dates were processed by extraction using heating and filtration at step 10 to obtain the Dips syrup at 12. Both the Dips syrup and pure molasses were purified and sterilized (as described above) at step 14, and stored in bottles until required. The mineral medium was prepared at step 16 and sterilized in the bioreactor at step 18. The inoculum of *S. cerevisiae* was prepared as described above (step 20). The substrates (pure Dips 22, pure molasses 24, or a mixture of Dips/molasses 26) were placed in the bioreactor with the mineral medium and the inoculum and allowed to propagate for twelve hours (step 28), periodically adding additional substrate at a rate that gradually increased from 12 g/hr to 53 g/hr (step 30) in a fed-batch process, with periodic monitoring of sugar and alcohol levels. Molasses produced an overall yield of 93.5%, as indicated at 32, and served as a reference. Pure Dips only produced an overall yield of 59.7% (shown at 34), while the 1:1 mixture (w/w) of Dips and molasses produced a yield of 93.1% (shown at 36), which is comparable to pure molasses.

[0044] Although a 1:1 weight/weight mixture of Dips/molasses produced good results with the particular sample of date syrup derived from Rezez dates illustrated in Example 2, dilutions other than 1:1 (w/w) Dips/molasses may be required to produce good yields from date syrup extracted from other varieties of dates. It should be well within the ability of one of ordinary skill in the art to analyze the date syrup substrate to determine the presence and concentration of the toxins listed in Table 4 and to adjust the amount of molasses used to dilute the toxins in the date syrup to safe levels in order to produce an overall yield of Baker's yeast comparable to that obtained from pure molasses, thereby reducing the amount of molasses required and making use of a resource (dates) that would otherwise go to waste.

Example 3

[0045] Arabic bread has a round shape and forms pockets because of the high baking temperatures that make the dry exterior skin to set and carbon dioxide and water vapor to expand. These gasses disperse till the pressure is sufficient enough to force separation of the lower and upper layers, a phenomenon referred to as pocket formation. It has been reported that white flour produced from hard wheat with intermediate strength and protein content of 10-12% gave high quality Arabic bread. This example aims to evaluate the effect of using Baker's yeast produced using date syrup as a substrate on quality characteristics of Arabic bread.

[0046] The flour used in the experiments was commercial local flour from hard wheat (Yecora Rojo variety), extraction rate of 80% and production year 2006, obtained in 10-kg paper packs (Grain Silos and Flour Mills Organization, Dammam, Saudi Arabia). The flour had 13.4% protein and 0.65% ash.

[0047] For flour, the falling number was determined according to the method standardized by international bodies (Perten Instruments group, 2009), using the Perten instrument model 1700, Hagberg, Sweden. Flour (6.9 gram) was weighed based on 14% moisture content, transferred into the viscometer-tube tipped to 45 angle, 25 ml distilled water

added, the tube shaken 10 times to obtain a uniform suspension of flour and water, and placed with a stirrer in the boiling water bath. The stirring apparatus was started immediately. Heating (about 100° C.), causes starch granules to swell and the viscosity of the suspension to increase. After stirring the sample for 60 seconds, the plunger was dropped for free fall. The rate and extent to which the viscosity of the starch suspension was reduced indicated the level of alpha amylase present. The optimum falling number is obtained in the reading between 200 and 300. This indicates optimal amylase activity, and due to this the wheat bread crumb is likely to be good.

[0048] Farinograph measures and records the resistance of dough to mixing. It is used to evaluate the water absorption capacity of the flour to determine the stability of dough during mixing. Measurement was done according to the AACC (1995) approved method 54-21 with the small (50 gram) mixing bowl of a Brabender farinograph (C.W. Brabender Instruments, Inc. South Hackensack, N.J., USA). After one minute dry mixing, sufficient water was added within 25 seconds, till maximum resistance was centered on the 500 Brabender Unit line. When the dough began to form, the sides of the bowl were scraped down with a plastic scraper, and the machine was permitted to run until an adequate curve was available (i.e. absorption, slightly beyond peak; stability, until top of curve recorded 500 BU line after peak; 12 minutes beyond the peak). The test was run three times, and then the absorption was calculated on a 14% moisture basis.

[0049] Gluten Indices of flour samples were determined by the AACC (1995) approved method 38-12 using the Glutomatic 2200 (Perten Instrument AB, Stockholm, Sweden). Wet gluten is washed from the flour sample, centrifuged through a sieve and the weight of wet gluten forced through the sieve and that of the total wet gluten were measured. The total wet gluten was expressed as percent of sample, and the gluten index was expressed as percentage of wet gluten remaining on the sieve after centrifuging.

[0050] Baking was made according to Qarooni et al., "A test baking technique for Arabic bread quality", J. Cereal Sci. 6: 69-80 (1987). A modified bread formula was chosen for this experiment. Dry ingredients: 700 g flour, 7 g salt, and 7 g yeast on dry weight basis (18 different bread treatments were prepared using the different produced baker's yeast treatments: molasses, date syrup, and 1:1 molasses to date syrup) at low and high flow rates, and were mixed at low speed for 1 min using Hobart mixer Model A-120 (The Hobart Manufacturing Company, Troy, Ohio), then water was added (30° C.) and mixing continued for 2 minutes at low speed, and then for 4 minutes at medium speed. The optimum amount of water was determined using the formula of Qarooni, "The Hand Book of Arabic Bread Production", published by Kuwait Flour Mills and Bakeries Co (S.A.K.) (1989) and Qarooni et al., "Production of Tanoor Bread with Hard White and Other U.S. Wheats", Lebensm.—Wiss. U.—Technol. 26: 100-106 (1993), with some modifications based on experimental experience (Baking absorption (%)=20+0.596 multiplied by the water absorption capacity determined by the farinograph test described above). The dough was then left to ferment in bulk for one hour at 30° C. and 85% relative humidity (rh), and then it was divided into pieces of 80 g, rounded by hand, covered with a cloth, and allowed to relax for 15 minutes in the same fermentation cabinet. These dough pieces were then flattened by hand and cross sheeted in a machine (0.8 mm thickness). All sheeted doughs were put in a wooden board and transferred into the proofing cabinet for 30 min at 30° C. and 85% rh. The proofed pieces were put on a pre-heated solid aluminum tray and baked at 425° C. for 100 seconds in a bench top furnace (Muffle-Thermolyne 6000 Series). Loaves were cooled for 15 min and wrapped in plastic bags.

[0051] Samples of dough prepared as described above were used for the estimation of yeast activity by measuring the gas production ability of the yeast. Measuring cylinders were used for assessing gas production ability. Twenty grams of dough was carefully placed in a 100-ml glass measuring cylinder, which was then incubated at 300° C. and 90% relative humidity in a National MFG incubator (National MFG. Co., Lincoln, Nebr.). The increase in dough volume due to CO₂ production was measured every 30 minutes for two hours.

[0052] The average protein content for flour (80% extraction) used in this study was 13.4%, which is somewhat higher than recommended, and may result in a decrease in dough strength and elasticity. It was also found that Farinograph water absorption was 66.6% for flour used in this study, which is within recommended ranges.

[0053] All reported data are average of three replicates. Gluten of tested flour indicated high wet gluten weight being 29.71 g. On the other hand, the gluten index value and dry gluten content were 99.36% and 11.85 g respectively.

[0054] The Falling Number is a method of determining the relative level of alpha amylase activity. The falling number of the experimental flour was 447 seconds. It has been reported that a falling number value of 350 seconds or longer indicate low enzyme activity and very sound wheat. As the amount of enzyme activity increases, the falling number decreases. Values below 200 seconds indicate high level of enzyme activity.

[0055] Samples of the prepared bread dough used for Arabic bread making were also used for estimation of yeast activity through gas production ability. Values of gas production power (ml/20 gm dough) of the experimental yeast are presented in (Table 9). It could be noted that there were significant differences due to the substrate used in yeast propagation, and also for the flow rate used. The highest significant effect on the gas production power was noticed for the flow rate. Usually the baker's yeast produced using the low flow rate showed significantly higher gas production power than those produced following the high flow rate system.

TABLE 9

Gas production power (ml/20 g dough) for baker's yeasts							
Run	Substrate	Flow	Incubation Time (min.)				
		Rate	Zero	30	60	90	120
Strain NCYC 1530							
13	Molasses	Low	18 ^c	31 ^f	42 ^d	44 ^e	45 ^f
14	Molasses	High	18 ^c	23 ^j	31 ^h	36 ^j	42 ⁱ

TABLE 9-continued

Gas production power (ml/20 g dough) for baker's yeasts							
Run	Substrate	Flow	Incubation Time (min.)				
		Rate	Zero	30	60	90	120
15	Date Syrup	Low	19 ^b	25 ^j	42 ^d	43 ^f	45 ^f
16	Date Syrup	High	18 ^c	34 ^e	43 ^e	44 ^e	46 ^e
17	1:1	Low	18 ^c	27 ^h	42 ^d	43 ^f	45 ^f
18	1:1	High	18 ^c	23 ⁱ	31 ^h	39 ^h	43 ^h
	Control*		18 ^c	36 ^e	46 ^a	49 ^a	50 ^a

*Control = Hollandia Yeast.

^{a-j} Within each column, means with the same letter are not significantly different.

[0056] Concerning the substrate used in the yeast production, it could be noticed there are insignificant differences for the gas production power between yeasts produced using either molasses or date syrup substrates. However the highest gas production power was noticed for yeasts produced using 1:1 molasses to date syrup substrate at the low flow rate system after 60, 90 and 120 minutes of incubation. These conditions of growth give biochemical properties of the yeast a special emphasis, and demand specific measures to ensure high quality and efficient dough aeration. The technological role of yeast in wheat flour dough is a strong alcoholic fermentation with extensive carbon dioxide liberation. The gasing power of pressed yeast depends on the zymase enzyme complex of the yeast cells, and available fermentable carbohydrates. The differences in the gassing power in the yeasts used in this work might be due to the various maltase and zymase activities of these yeasts.

[0057] The effect of the experimental baker's yeast strain produced from date syrup and molasses substrates under low and high flow rates on the quality of Arabic bread was investigated. Analysis of Variance (ANOVA) was performed to estimate the interaction effect among independent variables. Separation of means among all external and internal quality parameters were analyzed using least significant parameters, Fisher's (LSD) test.

[0058] The ANOVA analysis showing the effect of baker's yeasts from different fermentation treatments on Arabic bread quality can be observed in Table 10. There was strong interaction (Yeast*Substrate*Flow rate) effect on crust smoothness ($p \leq 0.05$) and shape ($p \leq 0.01$) values of Arabic bread. Breads made with yeasts from date syrup showed no significant decrease in crust smoothness and shape among all yeast strains compared to those produced using molasses. Arabic bread made with yeasts and produced under the following parameters: 1:1 molasses to date syrup, Hollandia yeast, and high flow rate (Treatment #12) showed the highest score for bread shape as compared with other treatments (Tables 11A-11D). All breads showed a marked significant variation in crust smoothness.

TABLE 10

F-Factors (Analysis of Variance) of Arabic Bread.							
Quality attribute	Yeast	Substrate	Flow rate	Yeast * Substrate	Yeast * Flow rate	Substrate * flow rate	Yeast * Substrate * Flow rate
Crust smoothness	19.1***	7**	51**	4.8*	16**	NS	4.6**
Shape	4.2*	11.2**	NS	8***	37.2***	7.5**	99***
Crust color	6.3**	NS	NS	14.75***	6.8**	NS	6.2**

TABLE 10-continued

F-Factors (Analysis of Variance) of Arabic Bread.							
Quality attribute	Yeast	Substrate	Flow rate	Yeast * Substrate	Yeast * Flow rate	Substrate * Flow rate	Yeast * Substrate * Flow rate
Cracks	7.2**	9.5**	21.8**	2.9*	22.3***	NS	2.3***
Blisters	34***	8**	NS	4.8*	28.1***	NS	10.4***
Roll & fold (1)	NS	8**	29.7**	NS	7.5**	NS	7***
Separation of layers	NS	13**	NS	26***	NS	45***	NS
Evenness of Layer	NS	NS	NS	3.9**	NS	NS	11.7***
Grain appearance	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Grain uniformity	NS	NS	NS	NS	NS	NS	3.3*
Crumb texture	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Tearing quality (1)	5.4*	NS	30.2**	NS	NS	NS	3.6*
Crumb color	18***	83.1***	NS	NS	7.1**	NS	NS
Roll & fold (2)	NS	99***	402***	19.9***	25.***	NS	32***
Tearing quality (2)	133**	18.6***	NS	NS	26.1***	24.5***	999***
Total	8**	79***	29**	8.5***	999***	NS	999***

*Significant at $p \leq 0.1$ **Significant at $p \leq 0.05$ ***Significant at $p \leq 0.01$

NS Not Significant

[0059] Arabic bread showed a marked variation in crust color, cracks and blisters among all treatments. There is a strong significant interaction effect (Yeast*Substrate*Flow rate) on crust color ($p \leq 0.05$) as well as blister appearance and cracks ($p \leq 0.01$) of the Arabic bread, as shown in Table 10. It could also be noted from results of Tables 11A-11D that there were insignificant difference in crust color, cracks and blisters in case of using date syrup baker's yeast as compared with those of molasses, but yeast produced from 1:1 date syrup to molasses showed the highest score for these bread properties.

[0060] The ability of Arabic bread to roll and fold was evaluated for the first and second day after baking. There was a strong interaction effect (Yeast*Substrate*Flow rate) on the roll and fold features of Arabic bread in the first day and in the second day ($P \leq 0.01$) as can be seen from (Table 10). Arabic bread made with yeast produced using date syrup as a substrate, low flow rate and Hollandia yeast (treatment #9) scored the highest value on the ability to roll and fold on the first as well as on the second day (Tables 11A-11D).

[0061] There was insignificant interaction effect due to the (Yeast*Substrate*Flow rate) on the quality of separation of layers. However, there was a strong interaction effect ($P \leq 0.01$) due to the (Substrate*Flow rate) on the quality of separation of layers (Table 10). There was a significant interaction effect ($P \leq 0.01$) due to the (Yeast*Substrate*Flow rate) on the evenness of layers. Arabic breads showed insignificant variation in the scores of both separation and evenness of layers among all treatments (Tables 11A-11D), which indicates that use of date syrup baker's yeast resulted in good quality Arabic bread.

[0062] There was insignificant interaction effect due to the yeast, substrate, flow rate as well as their interactions on grain

appearance, grain uniformity, crumb texture and crumb color. However, the only significant interaction effect ($P \leq 0.01$) was due to the (Yeast*Substrate*Flow rate) on the grain uniformity, and effect ($P \leq 0.05$) due to (Yeast*Flow rate) on crumb color. There was strong effect ($P \leq 0.01$) due to substrate on crumb color (Table 10). All Arabic breads showed no significant differences in values of grain appearance, grain uniformity and crumb texture among all treatments (Tables 11A-11D). Breads made with yeast produced from date syrup only showed the highest crumb color scores (Tables 11A-11D).

[0063] The ability of Arabic bread to tear in an acceptable manner was evaluated for the first and the second days. The interaction effect due to (Yeast*Substrate*Flow rate) on the tearing feature of Arabic white bread was significant in the first day and in the second day ($P \leq 0.1$) (Table 10). Tearing quality of Arabic bread made with NCYC 1530 Strain showed insignificant variations in tearing quality in the first day as could be seen from Tables 11A-11D. However, there was a marked significant variation in tearing quality of Arabic bread in the second day among all treatments (Table 10).

[0064] There was a significant interaction effect due to the (Yeast*Substrate*Flow rate) on the total score of the Arabic bread ($P \leq 0.01$), as can be seen in Table 10. Two treatments exhibited the highest overall total quality bread score. One of these two treatments was the Arabic breads made with yeast produced using date syrup, high flow rate, and NCYC 1530 yeast strain. The second was the Arabic bread with yeast made from 1:1 molasses to date syrup, NCYC 1530 yeast strain, and low flow rate. It has been reported that bread doughs prepared only from flour, water, yeast and salt (such as Arabic bread) will initially contain only about 0.5% of glucose and fructose derived from the flour. This is adequate to start fermentation

and to activate the yeast's adaptive malto-zymase system that is responsible for maltose fermentation. Different yeast strains have been shown to vary in their maltase activity, and may also exhibit variable maltase activity under different dough conditions. Yeast itself brings same changes in the bread dough in the course of fermentation, such as depletion of fermentable substances; accumulation of products in the form of carbon dioxide, alcohols, acids and esters; modification of pH conditions; and softening or mellowing of the gluten character. In this present example, all of these factors may have contributed to the quality differences among baker's yeast produced in this study.

[0065] Baker's yeasts produced using the date syrup substrate gave baking results and gas production power comparable to those of yeasts produced from molasses, indicating that using date syrup as substrate for baker's yeast production results in excellent quality yeasts to be used in baking industry.

TABLE 11A

Quality characteristic of Arabic bread from Saf-Instant Yeast						
Treatment	1	2	3	4	5	6
Substrate	Molasses	Molasses	Date Syrup	Date Syrup	1:1	1:1
Flow rate	Low	High	Low	High	Low	High
Crust smoothness (5)	4.5 ^c	4.7 ^c	5 ^a	4.8 ^{bc}	5 ^a	4.9 ^{ab}
Shape (8)	6 ^d	7 ^b	7 ^b	7 ^b	7 ^b	7 ^b
Crust color (8)	7.8 ^{ab}	7.7 ^{abc}	8 ^a	8 ^a	8 ^a	7.8 ^{ab}
Cracks (8)	6.8 ^b	6.9 ^{ab}	6.9 ^{ab}	6.9 ^{ab}	6.9 ^{ab}	6.9 ^{ab}
Blisters (8)	8 ^b	8 ^b	8 ^b	6.9 ^a	6 ^b	7.6 ^{cd}
Rolling and folding (1) (10)	10 ^a	10 ^a	10 ^a	10 ^a	10 ^a	10 ^a
Separation of layers (15)	15 ^{ab}	15 ^{ab}	15 ^{ab}	15 ^{ab}	14.8 ^b	15 ^{ab}
Evenness of layers (5)	5 ^a	5 ^a	5 ^a	5 ^a	5 ^a	5 ^a
Grain appearance (5)	5 ^a	5 ^a	5 ^a	5 ^a	5 ^a	5 ^a
Grain uniformity (5)	5 ^a	5 ^a	5 ^a	5 ^a	5 ^a	5 ^a
Crumb texture (8)	7 ^a	7 ^a	7 ^a	7 ^a	7 ^a	7 ^a
Tearing quality (1) (10)	8 ^a	8 ^a	8 ^a	8 ^a	8 ^a	8 ^a
Crumb color (5)	4.8 ^{ab}	4.6 ^c	5 ^a	5 ^a	5 ^a	4.8 ^{ab}
Rolling and folding (2) (30)	13.3 ^{ef}	11.3 ^{gh}	13.9 ^{de}	13.3 ^{ef}	13.5 ^{de}	9.3 ^c
Tearing quality (2) (20)	9.3 ^c	9.6 ^c	9.8 ^{bc}	9.6 ^c	9.3 ^c	9.5 ^c
Total (150)	115.9 ^{hi}	115.1 ⁱ	119.8 ^{cde}	116.5 ^{fgh}	117.3 ^{efg}	115.4 ⁱ

TABLE 11B

Quality characteristic of Arabic bread from Hollandia Yeast						
Treatment	7	8	9	10	11	12
Substrate	Molasses	Molasses	Date Syrup	Date Syrup	1:1	1:1
Flow rate	Low	High	Low	High	Low	High
Crust smoothness (5)	5 ^a	4.5 ^c	5 ^a	5 ^a	4.8 ^{bc}	4.8 ^{bc}
Shape (8)	7 ^b	6.7 ^b	7 ^b	7 ^b	7 ^b	7.9 ^a
Crust color (8)	8 ^a	7.8 ^{ab}	7 ^e	8 ^a	7.7 ^{bc}	7.9 ^{ab}
Cracks (8)	6.9 ^{ab}	6.9 ^{ab}	6.9 ^{ab}	6.9 ^{ab}	6.9 ^{ab}	6.9 ^{ab}
Blisters (8)	7.8 ^{cb}	8 ^b	7.5 ^d	8 ^b	7.8 ^{bc}	8.3 ^a
Rolling and folding (1) (10)	10 ^a	10 ^a	10 ^a	9.8 ^a	10 ^a	8.8 ^c
Separation of layers (15)	15 ^{ab}	15 ^{ab}	15 ^{ab}	15 ^{ab}	15 ^{ab}	15 ^{ab}
Evenness of layers (5)	5 ^a	5 ^a	5 ^a	5 ^a	4.8 ^b	5 ^a
Grain appearance (5)	5 ^a	5 ^a	5 ^a	5 ^a	5 ^a	5 ^a
Grain uniformity (5)	5 ^a	5 ^a	5 ^a	5 ^a	5 ^a	5 ^a
Crumb texture (8)	7 ^a	7 ^a	7 ^a	7 ^a	7 ^a	7 ^a
Tearing quality (1) (10)	7.7 ^a	8 ^a	7.9 ^{ab}	7.9 ^{ab}	7.8 ^d	7.9 ^c
Crumb color (5)	4.5 ^d	4.7 ^c	5 ^a	5 ^a	4.8 ^{ab}	5 ^a
Rolling and folding (2) (30)	9.3 ⁱ	9.3 ⁱ	21.6 ^a	14 ^{de}	18 ^b	12.3 ^{efg}
Tearing quality (2) (20)	7 ^{de}	6.2 ^a	8 ^d	9.6 ^c	8 ^d	9.3 ^c
Total (150)	109.9 ^{jk}	108.3 ^k	123 ^a	116.5 ^{cde}	119 ^{bcd}	116.1 ^{gh}

TABLE 11C

Quality characteristic of Arabic bread from <i>S. cerevisiae</i> strain NCYC 1530 Yeast						
Treatment	13	14	15	16	17	18
Substrate	Molasses	Molasses	Date Syrup	Date Syrup	1:1	1:1
Flow rate	Low	High	Low	High	Low	High
Crust smoothness (5)	5 ^a	5 ^a	5 ^a	5 ^a	5 ^a	5 ^a
Shape (8)	7 ^b	6.6 ^{cb}	7 ^b	6.3 ^{cd}	7 ^b	6.1 ^d
Crust color (8)	7.2 ^{de}	7.5 ^{cd}	8 ^a	7.9 ^{ab}	7.8 ^{ab}	7.7 ^{bc}

TABLE 11C-continued

Quality characteristic of Arabic bread from <i>S. cerevisiae</i> strain NCYC 1530 Yeast						
Treatment	13	14	15	16	17	18
Cracks (8)	6.9 ^{ab}	6.4 ^c	6.9 ^{ab}	6.9 ^{ab}	7 ^a	6.5 ^c
Blisters (8)	8 ^b	8 ^b	8 ^b	8 ^b	8 ^b	8 ^b
Rolling and folding (1) (10)	9.8 ^a	9.3 ^{bc}	10 ^a	9.6 ^{ab}	9.6 ^{ab}	9.6 ^{ab}
Separation of layers (15)	15 ^{ab}	14.6 ^c	15 ^{ab}	15 ^{ab}	15 ^{ab}	15 ^{ab}
Evenness of layers (5)	5 ^a	5 ^a	5 ^a	5 ^a	5 ^a	4.8 ^b
Grain appearance (5)	5 ^a	5 ^a	5 ^a	5 ^a	5 ^a	5 ^a
Grain uniformity (5)	5 ^a	5 ^a	5 ^a	5 ^a	5 ^a	5 ^a
Crumb texture (8)	7 ^a	7 ^a	7 ^a	7 ^a	7 ^a	7 ^a
Tearing quality (1) (10)	8 ^a	8 ^a	8 ^a	8 ^a	8 ^a	8 ^a
Crumb color (5)	4.6 ^c	4.5 ^d	5 ^a	5 ^a	4.8 ^{ab}	4.8 ^{ab}
Rolling and folding (2) (30)	13.3 ^{ef}	10 ^{hi}	13.6 ^{de}	16 ^c	14 ^{de}	15 ^c
Tearing quality (2) (20)	12.3 ^a	9 ^e	12.3 ^a	12 ^a	12.6 ^a	10.6 ^b
Total (150)	116.1 ^{def}	111 ^j	120 ^{bcd}	121 ^{ab}	121 ^{ab}	118.7 ^{cde}

TABLE 11D

Quality characteristic of Arabic bread – Control = Hollandia Yeast	
Quality	Score
Crust smoothness (5)	4.8 ^{bc}
Shape (8)	6.9 ^b
Crust color (8)	8 ^a
Cracks (8)	7 ^a
Blisters (8)	7.8 ^{bc}
Rolling and folding (1)(10)	9.8 ^a
Separation of layers (15)	15 ^{ab}
Evenness of layers (5)	5 ^a
Grain appearance (5)	5 ^a
Grain uniformity (5)	5 ^a
Crumb texture (8)	7 ^a
Tearing quality (1)(10)	7.8 ^{ab}
Crumb color (5)	5 ^a
Rolling and folding (2)(30)	13 ^f
Tearing quality (2)(20)	9 ^c
Total (150)	115.1 ⁱ

In Tables 11A through 11D, the same letter superscript means not significantly different

[0066] It is to be understood that the present invention is not limited to the embodiments described above, but encompasses any and all embodiments within the scope of the following claims.

1. A method of producing baker's yeast, comprising the steps of:

preparing a substrate containing a substantially 1:1 mixture (w/w) of date syrup and molasses;

inoculating the substrate with *Saccharomyces cerevisiae* yeast;

placing the inoculated substrate in a fermentation vessel; propagating the yeast under fermentation conditions;

periodically feeding additional substrate to the propagating yeast in quantities calculated to maintain yeast growth at a rate that avoids respirofermentative growth and formation of ethanol; and

collecting viable yeast when propagation ceases.

2. The method of producing of baker's yeast according to claim 1, further comprising the step of adding an effective amount of ammonium sulfate and ammonium phosphate to the substrate in order to supply quantities of nitrogen, phosphorus, and sulfur lacking in the substrate but required for propagation of the yeast.

3. The method of producing of baker's yeast according to claim 1, further comprising the step of adding sulfuric acid to the substrate to adjust the pH to about 4.5.

4. The method of producing of baker's yeast according to claim 1, further comprising the step of stirring the inoculated substrate in the fermentation vessel to aerate the mixture.

5. The method of producing of baker's yeast according to claim 1, wherein the date syrup is extracted from Rezez dates.

6. The method of producing of baker's yeast according to claim 1, wherein the molasses is produced from sugar cane.

7. Arabic bread leavened with yeast produced according to the method of claim 1.

8. A method of producing of baker's yeast, comprising the steps of:

analyzing date syrup to determine concentrations of organic acids toxic to yeast present in the date syrup;

diluting the date syrup with a volume of molasses sufficient to lower the concentrations of the toxic organic acids to safe levels, thereby forming a substrate, wherein the substrate is a substantially 1:1 mixture (w/w) of date syrup and molasses;

inoculating the substrate with *Saccharomyces cerevisiae* yeast;

placing the inoculated substrate in a fermentation vessel; propagating the yeast under fermentation conditions;

periodically feeding additional substrate to the propagating yeast in quantities calculated to maintain yeast growth at a rate that avoids respirofermentative growth and formation of ethanol; and

collecting viable yeast when propagation ceases.

9. (canceled)

10. The method of producing of baker's yeast according to claim 8, further comprising the step of adding an effective amount of ammonium sulfate and ammonium phosphate to the substrate in order to supply quantities of nitrogen, phosphorus, and sulfur lacking in the substrate but required for propagation of the yeast.

11. The method of producing of baker's yeast according to claim 8, further comprising the step of adding sulfuric acid to the substrate to adjust the pH to about 4.5.

12. The method of producing of baker's yeast according to claim 8, further comprising the step of stirring the inoculated substrate in the fermentation vessel to aerate the mixture.

13. The method of producing of baker's yeast according to claim 8, wherein the date syrup is extracted from Rezez dates.

14. The method of producing of baker's yeast according to claim **8**, wherein the molasses is produced from sugar cane.

15. Arabic bread leavened with yeast produced according to the method of claim **8**.

16. The method of producing of baker's yeast according to claim **8**, wherein the organic acids toxic to yeast present in the date syrup are selected from the group consisting of formic acid, acetic acid, and propionic acid.

17. The method of producing of baker's yeast according to claim **8**, wherein the step of diluting the date syrup comprises

diluting the date syrup with a volume of molasses sufficient to lower the concentration of any formic acid in the date syrup to less than 0.25% (w/v).

18. The method of producing of baker's yeast according to claim **8**, wherein the step of diluting the date syrup comprises diluting the date syrup with a volume of molasses sufficient to lower the concentration of any acetic acid and propionic acid, added together, in the date syrup to less than 3% (w/v).

* * * * *