

Львівський національний університет ветеринарної медицини

та біотехнологій імені С.З. Гжицького

Факультет харчових технологій та біотехнологій

Кафедра біотехнологій та радіології

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на здобуття освітнього ступеня бакалавра

на тему: «Дослідження впливу штамів хлібопекарських
дріжджів на їх фізико-хімічні показники»

Виконала: студентка 4 курсу,

групи 1, спеціальності

162 «Біотехнології та біоінженерія»

Малащук Оксана Олександрівна

Керівник: к.с.-г.н., с.н.с., доцентка

кафедри біотехнології та радіології

Сварчевська Оксана Зіновіївна

Рецензент: с.в. кафедри епізоотології,

кандидат ветеринарних наук

Руденко Ольга Петрівна

Робота заслухана на засіданні кафедри біотехнології та радіології і
рекомендована до захисту ЕК, протокол № 33 від 18.06.2024 р.

Завідувач кафедри біотехнології та радіології,

професор, д.с.-г.н.

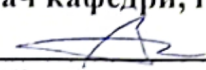
Буцяк В. І.

Львів – 2024

ЗАТВЕРДЖЕНО
Наказ Міністерства освіти і науки,
молоді та спорту України
29 березня 2012 року № 384
Форма № Н-9.01

Львівський національний університет ветеринарної медицини та
біотехнологій імені С.З. Гжицького

Інститут, факультет, відділення факультет харчових технологій та біотехнологій
Кафедра, циклова комісія кафедра біотехнологій та радіології
Освітньо-кваліфікаційний рівень бакалавр
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

ЗАТВЕРДЖУЮ
завідувач кафедри, голова циклової
комісії  Буцяк В.І.
“26” 02 2024 року

ЗАВДАННЯ НА БАКАЛАВРСЬКУ КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧУ

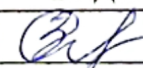



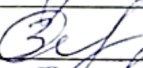
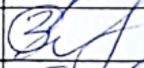
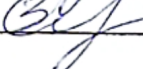
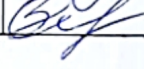
Малашук Оксані Олександрівні

1. Тема бакалаврської роботи “Дослідження впливу штамів хлібопекарських дріжджів на їх фізико-хімічні показники”.
Керівник бакалаврської роботи Сварчевська Оксана Зіновіївна, к.с.-г.н., с.н.с.
затверджені наказом вищого навчального закладу від 19.02.2024 року №139-4
2. Строк подання бакалаврської роботи 14.06.2024 року.
3. Вихідні дані до бакалаврської роботи.
Вихідні матеріали до виконання роботи: хлібопекарські дріжджі, біомаса дріжджів, культивування, скринінги OD, *Saccharomyces cerevisiae*, підйомна сила, поживні середовища, аерація, безпроточна ферментація, АСБ.
4. Зміст бакалаврської роботи (перелік питань, які потрібно розробити) вступ, огляд літератури, умови та методика проведення досліджень, результати досліджень, висновки, список використаної літератури.
5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень) графіки, діаграми, рисунки, технологічні схеми, технологічні лінії)
Рисунки: штам пекарських дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* IMB-V-5016; процесуальна схема виробництва хлібопекарських дріжджів; досліджувані зразки; розливання середовища YPD по чашках Петрі; спектрофотометр Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer; pH-метр METTLER TOLEDO S230-KIT; ферментер BioFlex; центрифуга Rotanta 260;

суспензія дріжджів; вакуум-фільтр; зразок дріжджів в процесі вакуум-фільтрації; приклад отриманого брусочка дріжджів; ферментограф YeastFors. Схеми: схема дослідження лабораторного одержання штамів хлібопекарських дріжджів.

Графіки: крива росту дріжджів на 4% середовищі; крива росту дріжджів на 7,5% середовищі; графіки рівня рН та розчиненого кисню в ході ферментації; графіки виходу CO₂ у зразку №1 у штамів, одержаних лабораторним та промисловим шляхом; графіки виходу CO₂ у зразку №2 у штамів, одержаних лабораторним та промисловим шляхом; графіки виходу CO₂ у зразку №3 у штамів, одержаних лабораторним та промисловим шляхом; графіки виходу CO₂ у зразку №4 у штамів, одержаних лабораторним та промисловим шляхом.

6. Консультанти розділів бакалаврської роботи

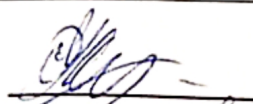
Розділ	Консультант ПІБ, посада	Підпис, дата	
		Завдання видав	Завдання прийняв
1. Літературний огляд	доц. Сварчевська О.З.		
2. Методика експерименту та основні методи досліджень	доц. Сварчевська О.З.		
3. Експериментальна частина	доц. Сварчевська О.З.		
4. Висновки	доц. Сварчевська О.З.		

7. Дата видачі завдання 26.02.2024 року


КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів бакалаврської роботи	Термін виконання	Примітка
1.	Літературний огляд.		35%
	I атестація:	26.04.24р.	35%
2.	Методика експерименту та основні методи досліджень.		20%
3.	Експериментальна частина.		40%
	II атестація:	30.05.24р.	55%
4.	Висновки		5%
	III атестація:	6.06.24р.	10%
	Допущено до захисту.	14.06.24р.	100%

Здобувач

 Малащук О.О.

Керівник бакалаврської роботи

 Сварчевська О.З.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	7
1.1. Загальна характеристика хлібопекарських дріжджів	7
1.2. Шляхи інтенсифікації промислового виробництва дріжджової біомаси	9
1.3. Опис технології виробництва хлібопекарських дріжджів	11
РОЗДІЛ 2. УМОВИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ	17
2.1. Схема дослідження	17
2.2. Поживні середовища та їх компоненти	18
2.3. Підготовка посівного матеріалу та накопичення біомаси	21
2.3.1. Посів на чашки Петрі	21
2.3.2. Вирощення дріжджів у рідкому середовищі	23
2.3.3. Скринінги росту	23
2.4. Визначення рН в культуральному середовищі	25
2.5. Формольне титрування	26
2.6. Культивування у BioFlex	26
2.6.1. Підготовка до культивування	27
2.6.2. Сепарація вирощених дріжджів	28
2.7. Ферментограф YeastFors	31
2.7.1. Приготування зразка тіста	32
2.7.2. Підготовка до вимірювання газоутворення за допомогою ферментографа YeastFors	33
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	34
3.1. Вплив вмісту цукрів в середовищі на криву росту дріжджів	34
3.2. Аналіз виходу ферментації та фізико-хімічних показників культуральної рідини	36
3.3. Аналіз значень рН та розчиненого кисню у процесі культивування дріжджів	38
3.4. Визначення інтенсивності газоутворення дріжджів, одержаних лабораторним та промисловим шляхом	39
ВИСНОВКИ	45
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	46

АНОТАЦІЯ

Загальна характеристика роботи. Робота написана на 50 сторінках комп'ютерного тексту. Складається із вступу, 3-ох розділів, висновків, списку використаної літератури, що містить 35 джерел; містить 20 рисунків та 3 таблиці.

Проведено аналіз літературних джерел щодо вирощення та особливостей хлібопекарських дріжджів. Досліджено приріст біомаси дріжджів і показники рН, вмісту цукру, спирту та формольного числа, що є основними характеристиками у процесі культивування дріжджів, крім того досліджувалась підйомна сила різних видів дріжджів. Результати досліджень вказують, що дріжджі торгової марки Dr.Oetker можна охарактеризувати, як дріжджі з високою продуктивністю та виходом по ферментації, що забезпечило найвищі показники приросту біомаси в лабораторних умовах і при дослідженні підйомної сили.

Ключові слова: хлібопекарські дріжджі, біомаса дріжджів, культивування, скринінги OD, *Saccharomyces cerevisiae*, підйомна сила, поживні середовища, аерація, безпроточна ферментація, АСБ.

Актуальність теми. Одержання дріжджів є критично важливим процесом для харчової промисловості, зокрема для виробництва хлібобулочних виробів, пива та інших ферментованих продуктів. Дріжджі забезпечують підйом тіста та покращують його смакові якості, що робить їх незамінним компонентом в багатьох технологічних процесах. Традиційно, промислове виробництво дріжджів здійснюється у великих масштабах з використанням стандартних технологічних рішень, які забезпечують стабільність та продуктивність. Однак, останні дослідження показали, що лабораторне одержання дріжджів може мати певні переваги, зокрема у вигляді вищої підйомної сили дріжджів.

Дослідження показали, що лабораторно отримані дріжджі мають кращу підйомну силу, що забезпечує кращу текстуру та структуру хлібобулочних

виробів. Це сприяє підвищенню якості продукції та задоволенню вимог споживачів.

Розвиток нових методів культивування дріжджів в лабораторних умовах стимулює впровадження інноваційних технологій у промислове виробництво. Це може включати оптимізацію живильних середовищ, умов культивування та методів збору дріжджів.

Отже, порівняння лабораторного та промислового одержання дріжджів є надзвичайно актуальним завданням. Лабораторне виробництво дріжджів, завдяки своїм перевагам у виході АСБ та підйомній силі, може стати основою для вдосконалення існуючих промислових технологій. Це дозволить підвищити ефективність виробництва, покращити якість кінцевої продукції та знизити екологічний вплив виробничих процесів.

Мета роботи: визначити найбільш пристосований штам дріжджів, з'ясувати за яких умов дріжджі найкраще здійснюють приріст біомаси та дослідити показники підйомної сили дріжджів, отриманих лабораторним і промисловим шляхом.

Для досягнення мети поставлено такі завдання:

- скринінг OD на різних середовищах для оптимізації;
- нарощення біомаси дріжджів;
- спостереження за процесами ферментації дріжджів;
- аналіз виходу ферментації;
- визначення підйомної сили у лабораторних та промислових дріжджів;
- провести аналіз одержаних результатів на основі проведених досліджень.

Об'єкт дослідження:

- 1 зразок – «Львівські дріжджі»;
- 2 зразок – «Dr.Oetker»;
- 3 зразок – «Саф-Момент»;
- 4 зразок – «Vitana».

Предмет дослідження: аналіз росту різних видів дріжджів за різних умов культивування та порівняння лабораторних і промислово одержаних штамів.

Методи дослідження: аналіз літературних джерел, скринінг OD на різних середовищах, нарощування біомаси дріжджів, ферментація дріжджів, аналіз виходу ферментації, визначення підйомної сили дріжджів, формольне титрування, культивування у BioFlex, ферментограф YeastFors.

Практичне значення одержаних результатів: покращення якості хлібопекарських дріжджів, вдосконалення промислових технологій, зниження екологічного впливу, підвищення якості хлібобулочних виробів, оптимізація поживних середовищ і біотехнологічних процесів.

ВСТУП

Дріжджі є одним з найбільш використовуваних об'єктів в промисловій біотехнології. Вони володіють надзвичайно широким спектром властивостей, що дозволяє вирощувати їх на різноманітних субстратах, включаючи органічні відходи, та отримувати при цьому як продукти багатотоннажного мікробіологічного синтезу (дріжджова біомаса, кормовий білок, етанол), так і специфічні біологічно активні речовини (інсулін, інтерферон і т.д.). Найбільше застосування дріжджі знаходять в якості агентів бродіння в процесах пивоваріння, виноробства, хлібопечення, виробництва спирту. Історія використання дріжджів людиною налічує тисячі років, однак і на сьогодні в технології дріжджового виробництва та в практиці застосування дріжджів існує чимало наукових пошуків, пов'язаних з підвищенням ефективності засвоєння субстратів, стимуляцією бродильної активності [10].

В залежності від сфери використання, розрізняють хлібопекарські, спиртові, винні, пивні дріжджі, які, як правило, належать до роду *Saccharomyces* і є штамами виду *Saccharomyces cerevisiae*. Характерною їх ознакою є здатність до життєдіяльності в аеробних та анаеробних умовах. При наявності достатньої кількості кисню у навколишньому середовищі, дріжджі активно окислюють органічні субстрати, синтезують внутрішньоклітинні компоненти і, таким чином, нагромаджують власну біомасу. Саме цей процес є основним на дріжджових заводах, де виробляють біомасу різного призначення. За відсутності кисню дріжджі, на відміну від аеробів, здатні здійснювати безкисневе перетворення органічних речовин, зокрема, розщеплювати вуглеводи до кінцевого продукту обміну – етилового спирту. Насправді, під час спиртового бродіння в культуральну рідину виділяється багато низькомолекулярних органічних сполук (спирти, кислоти, естери), роль яких у формуванні властивостей кінцевого продукту є різною. Спиртове бродіння становить основу більшості біотехнологічних процесів, де використовуються дріжджі, зокрема, у хлібопеченні.

Роль дріжджів у хлібопекарному виробництві полягає в розпушенні тіста. Дріжджі зброджують вуглеводи борошна і мальтозу, яка утворюється з крохмалю з виділенням спирту та карбон (IV) оксиду. При цьому утворюються побічні продукти (оцтовий альдегід, спирти, органічні кислоти, ароматичні речовини – діацетил, ацетоїн, естери), які формують смак і аромат хліба [28].

Використовувані при виробництві хліба дріжджі часто не відповідають нормам якості за показниками активності бродильних ферментів. Тому така проблема для хлібопекарських підприємств як збільшення активності бродильного комплексу ферментів дріжджів на сьогодні є актуальною і, таким чином, при виборі хлібопекарських дріжджів до них висувають високі вимоги, зумовлені широтою інтенсивних технологій приготування тіста та економічними аспектами – необхідністю зниження дози дріжджів за умови, що вони мають високу активність бродильних ферментів.

Показники якості дріжджів та активність їх бродильного комплексу ферментів визначаються впливом різноманітних умов, наприклад: характер сировини, спосіб культивування, температура, рН середовища, швидкість аерації, спосіб виділення дріжджів з культуральної рідини та ін.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика хлібопекарських дріжджів

Дріжджі здавна застосовувалися в практиці бродильних виробництв і хлібопеченні, навіть тоді, коли природа їх була невідома. Хлібопекарські дріжджі відповідно до класифікації Крегер-ван-Рей відносяться до царства грибів *Mycota*, до відділу *Eumycota*, до класу *Ascomycetes*, сімейства *Saccharomycetaceae*, до роду *Saccharomyces*, виду *Saccharomyces cerevisiae*. Дріжджі цього виду мають здатність використовувати прості цукри середовища двома шляхами: ферментувати їх в умовах дефіциту кисню з утворенням етанолу та карбон (IV) оксиду, або окиснювати до карбон (IV) оксиду та води при достатній кількості кисню в середовищі. Завдяки цим властивостям хлібопекарські дріжджі швидко розмножуються і накопичують біомасу в умовах інтенсивної аерації, що створюється в ферментерах під час їх промислового культивування, а потім при внесенні в тісто ферментують вуглеводи борошна і тіста, істотно впливаючи на об'єм готового хліба та пористість м'якушу. Виділяючи при цьому карбон (IV) оксид і спирт, а також ряд побічних продуктів бродіння (оцтовий альдегід, бутиловий, ізобутиловий, ізоаміловий спирти, органічні кислоти), дріжджі надають специфічного смаку та аромату хлібобулочним виробам [27].

Ферменти дріжджів (β -фруктофуранозидаза, β -галактозидаза) знайшли застосування в кондитерській та інших галузях харчової промисловості.

Дріжджова клітина має складну будову, вона містить органели і включення. До органел відносяться клітинна стінка, цитоплазматична мембрана, цитоплазма і вмістимі в ній структури мітохондрії, вакуолі, апарат Гольджі, ядро. Включення - це тимчасові утворення клітини (глікоген, трегалоза, жир, метакроматин та ін.), які з'являються і зникають в процесі обміну речовин [31].

На вітчизняних підприємствах з виробництва хлібопекарських дріжджів широко використовується штам *Saccharomyces cerevisiae* IMB-Y-5016 (рис. 1.1).



Рис. 1.1. Штам пекарських дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*
IMB-Y-5016

Штам дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* IMB-Y-5016, одержаний селекційним методом гібридизації (схрещування) штаму Ш-1, забезпечує високу стійкість до спирту та підвищене накопичення біомаси, і характеризується наступними морфологічними та фізіологічними ознаками.

Розмір вегетативних клітин однодобової культури на солодовому суслі (неохмелене солодове сусло з вмістом сухих речовин 8%) - (3,8-7,5)х(5,0-10,0) мкм (середній). Форма клітин переважно яйцевидна. Вегетативне розмноження відбувається за рахунок брунькування. Колонії на солод-агарі після культивування при температурі 30°C протягом 96 годин мають кремовий колір, матову, гладку і пастоподібну консистенцію. Форма колонії округла, краї рівні, профіль конічний. Нарости на скошеному солод-агарі щільні, гладкі, матові, білі, пастоподібної консистенції, з рівними краями, хвилястим профілем [19].

Міцелій та псевдоміцелій не утворює. На рідкому солодовому суслі штам формує щільний осад, кільце, плівку не утворює. На ацетатному середовищі утворює аски з 1 - 4 круглими спорами з гладенькою оболонкою.

Saccharomyces cerevisiae є факультативним анаеробом. Оптимум росту - температура 30 - 35°C, рН - 4,2 - 5,5. Активно засвоює сахарозу, глюкозу, галактозу, мальтозу, 2/3 рафінози, прості декстрини солодового суслу, етанол, не утилізує лактозу, ксилозу, арабінозу, інулін та деякі спирти (гліцерин,

дульцин, маніт, сорбіт, інозит). Відношення до органічних кислот – асимілює оцтову і молочну кислоти, не засвоює бурштинову, яблучну, винну, лимонну кислоти [22].

1.2. Шляхи інтенсифікації промислового виробництва дріжджової біомаси

Потужність виробництва з випуску дріжджів може бути збільшена за рахунок кількості ферментаторів або їх сумарного робочого об'єму на останній стадії культивування, підвищення концентрації біомаси та інтенсифікації клітинного росту, що виражається у зменшенні часу культивування. Збільшення робочого об'єму ферментаторів призводить до додаткових капітальних вкладень, зростання енерговитрат і допоміжних матеріалів, пов'язаних з миттям і технічним обслуговуванням ферментаторів. Крім того, зростає час, необхідний на підготовчі роботи [16].

При культивуванні хлібопекарських дріжджів в ферментаторі з геометричним об'ємом 100 м^3 до концентрації 90 кг/м^3 і кінцевим робочим об'ємом 50 м^3 можна отримати 4,5 тони дріжджів з вмістом сухих речовин 25%. В той же час аналогічну кількість біомаси можна отримати при культивуванні в апараті з геометричним об'ємом 30 м^3 до кінцевої концентрації 450 кг/м^3 і кінцевому об'ємі 10 м^3 [24].

Перспектива збільшення кінцевої концентрації дріжджів, тобто проведення культивування одноклітинних організмів при високій концентрації їх у ферментаторі на всіх стадіях технологічного процесу, незаперечна: вивільняється виробнича площа, зменшуються витрати енергії і води на проведення процесу, водяної пари і мийних засобів на стерилізацію внутрішньої поверхні ферментатору та її миття [12]. Крім того, проведення культивування до концентрації біомаси $400\text{-}500 \text{ кг/м}^3$ дозволить скоротити число стадій сепарації, зменшити втрати біомаси при проведенні цього процесу, а високий вміст дріжджових клітин в одиниці об'єму культуральної рідини сам

по собі перешкоджає розвитку сторонньої мікрофлори в середовищі. Більше того, таке проведення процесу доцільне з екологічної точки зору, оскільки зменшує об'єм стоків, що підлягають очищенню [21].

В роботі [13] досліджена можливість культивування хлібопекарських дріжджів при високих концентраціях біомаси і розроблена конструкція кожухотрубного струминно-інжекційного ферментатора, який дозволяє реалізувати дану технологію. Принцип його роботи полягає в утворенні і рухові газорідинної суміші в трубах апарату за рахунок інжектуючої здатності вільного струменя рідини, що витікає з сопла певної форми, його динамічного впливу на суміш у низхідному потоці і газліфтного ефекту у висхідному. Конструктивно запропонований ферментатор складається з двох апаратів: теплообмінника-аератора та ємності-накопичувача. Теплообмінник-аератор представляє собою вертикальний кожухотрубний теплообмінник з видозміненою верхньою частиною. Ємність-накопичувач має форму циліндроконічного резервуару, який містить центральну трубу і циркуляційний стакан.

Найбільш важливим технологічним показником хлібопекарських дріжджів є мальтазна активність, оскільки у пшеничному тісті при бродінні утворюється велика кількість мальтози, швидке зброджування якої призводить до отримання хлібу високої якості. Підвищена активність мальтазних ферментів сприяє скороченню тривалості стадії бродіння опари приблизно на 1-1,5 год і дозволяє зменшити витрату дріжджів на замішування тістового напівфабрикату, при цьому тривалість бродіння лишається тією ж самою [8].

Підвищити бродильну активність дріжджів можна за допомогою мутаногенезу, гібридизації тощо [9]. Найбільш перспективний спосіб для виведення дріжджових рас з необхідними властивостями це метод гібридизації, оскільки при аутокросингу кількох дріжджових видів прицільно обираються раси з попередньо відомими потрібними властивостями [7]. Мутанти мають фермент галактозидазу, яка в якості субстрату використовує рафінозу, що гідролізується майже повністю до тих цукрів, які можуть використовувати

дріжджі. Також деякі дріжджові мутанти характеризуються підвищеною здатністю до розмноження і кращими хлібопекарськими властивостями [14].

Крім цього, бродильна активність пекарських дріжджів зумовлена атрибутами використовуваного дріжджового штаму і режимом його культивування. Чим більш концентрована та керована культуральна рідина, тим вища активність бродильного комплексу ферментів [11]. Необхідний для культивування об'єм повітря орієнтовно дорівнює 20 м^3 на 1 кг приросту дріжджів [20]. При збільшенні рівня рідини у ферментаторі витрату повітря можна зменшити за рахунок поліпшення розчинення кисню у товщині поживного середовища. Наприклад, при висоті рівня культуральної рідини 3 м потрібно 16 м^3 повітря на 1 кг приросту біомаси; при висоті 6 м – $8 \text{ м}^3/\text{кг}$, 8 м – 6 м^3 повітря на кг [30].

1.3. Опис технології виробництва хлібопекарських дріжджів

На рис. 1.2 наведено процесуальну схему виробництва хлібопекарських дріжджів. Процесуальна схема складається з технологічних процесів (ТП), допоміжних робіт (ДР), стадій знешкодження відходів (ЗВ) та стадії ПМВ - пакування, маркування, відвантаження [26].

Технологічний процес

ТП1 – вирощування чистих культур маткових дріжджів.

Процес вирощування дріжджів складається з двох етапів: одержання маткових і товарних дріжджів. Дріжджі одержують послідовним вирощуванням штаму *Saccharomyces cerevisiae* IMB-Y-5016 на вітамінізованому поживному середовищі за схемою: косяк→пробірка→колба→малий інокулятор→великий інокулятор.

Готову культуру, яка знаходиться в фазі експоненціального росту, з колб збирають в одну ємність при дотриманні правил асептики і переносять в малий інокулятор із стерильним охолодженим середовищем. Засів ведуть у полум'ї пальника через посівний патрубок інокулятора, при цьому в малий інокулятор

через індивідуальний фільтр подається стерильне повітря. Внаслідок цього отримують дріжджі чистої культури (ЧК). Готову культуру із малого інокулятора передавлюють стерильним повітрям у великий інокулятор на свіже поживне середовище і в подальшому отримують посівний матеріал для вирощування товарних дріжджів [17].

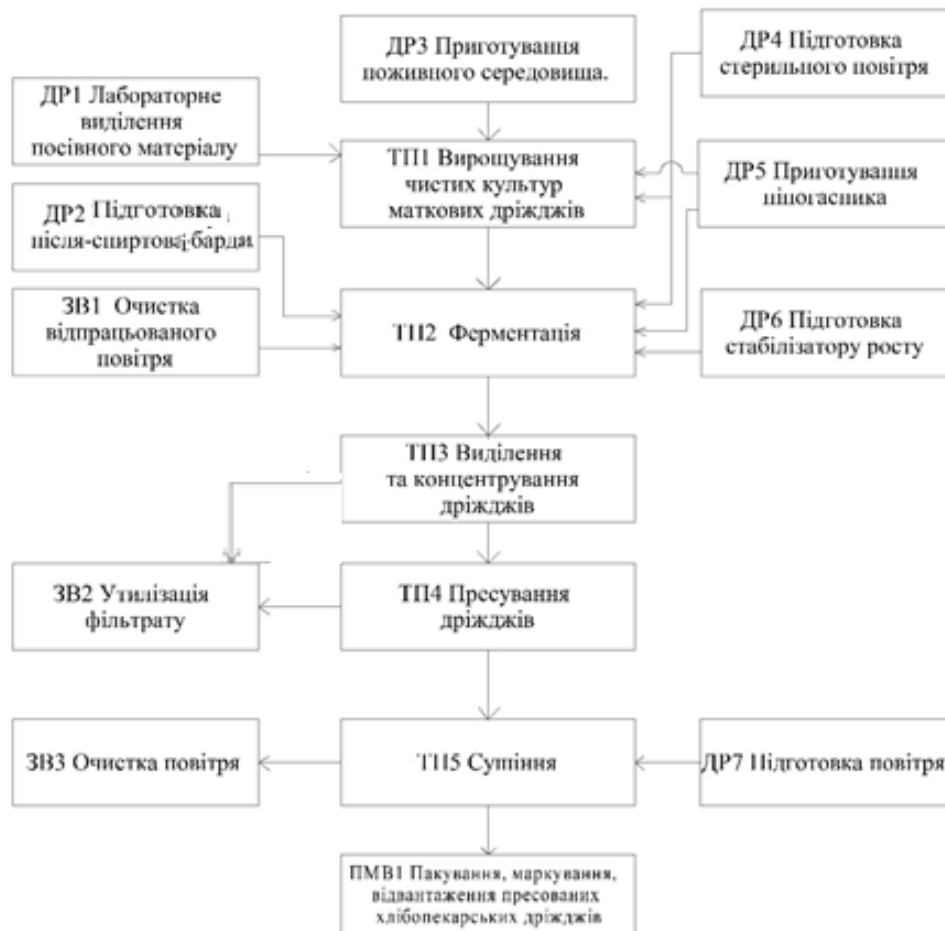


Рис. 1.2. Процесуальна схема виробництва хлібопекарських дріжджів

Одержання маткових дріждів проводять при дотримванні асептичних умов, які забезпечуються шляхом термічної стерилізації рідких технологічних потоків, обладнання, комунікацій при температурі, що забезпечує значення критерію стерилізації $\Delta=70-105$. Стерилізацію поживного середовища для маткових дріжджів здійснюють при температурі 128°C та критерію стерилізації $\Delta=93$.

Інокулятори оснащені мішалкою, аеруючим пристроєм, а також контрольно-вимірювальною апаратурою для регулювання температури, рН

середовища, рівня піноутворення та ін. Інокуляція відбувається при температурі 30°C, надлишковому тиску 0,02 МПа та постійній аерації. Культивування триває до певного значення титра клітин продуцента в культуральній рідині. Досягають кількості посівної культури для ферментації 10-12% [29].

ТП2 – ферментація.

Дріжджі певної щільності подають з великого інокулятора у ферментатор, у якому міститься стерильне рідке поживне середовище. Застосовуються великі засіви 30 ... 35% до маси поживного середовища, а розмноження стримують зниженням температури і зменшенням подання кисню для максимального використання дріжджами поживних речовин середовища. Температура ферментації становить на початку процесу 24⁰С з поступовим її збільшенням до кінця культивування до 30⁰С. Вихід дріжджів за наведеною схемою знаходиться на рівні 92% [23].

Аерація рідини сприяє піноутворенню, яке знижує якість ферментації, тому застосовують введення піногасників в культуральну рідину. Під час ферментації контролюють стан культури та накопичення продуктів біосинтезу, споживання компонентів середовища, вміст розчинного кисню (pO_2), рН культуральної рідини.

ТП3 – виділення та концентрування дріжджів.

Відділення дозрілих маткових і товарних дріжджів від культуральної рідини, згущення здійснюють в сепараторі. Культуральну рідину з ферментера подають до сепаратора, де відбувається відділення дріжджів від бражки та отримання концентрату 500-700 г/л. Згущені дріжджі називають дріжджовим молоком. При сепаруванні від дріжджів відділяється до 80% рідини. Остаточне відділення дріжджів від рідини відбувається на фільтр-пресі, в який подають дріжджове молоко з сепаратора. При цьому дріжджі набувають щільну консистенцію і форму пластин або пластівців різної товщини [25].

ТП4 – пресування дріжджів.

Подача дріжджового молока у фільтр-прес здійснюється за допомогою вихрового насоса, що забезпечує рівномірне, без поштовхів наповнення преса. Дріжджовий концентрат рухається по каналу, розташованому в центрі фільтр-преса або в спеціальних кишнях, з яких він через відповідні відгалуження надходить в порожнисті рами. Пресування триває від 30 хвилин до 2 годин і більше.

По закінченню пресування дріжджі, що відклалися на фільтрувальній тканині у вигляді щільного коржа, вивантажують в бункер і передають в сушильне відділення.

ТП5 – сушіння.

Сутність процесу сушіння дріжджів полягає у видаленні вологи з пресованих дріжджів. При цьому вологість їх знижується з 72% до 8-10%. В якості теплоносія використовують гаряче повітря.

Допоміжні роботи

ДР1 – лабораторне виділення посівного матеріалу.

Вторинний матеріал, який надходить із заводу з виробництва етилового спирту, підлягає вирощуванню в лабораторії в чотири стадії на солодовому вітамінізованому суслі з концентрацією сухих речовин 12-14% при рН 4,8-5,0. На четвертій стадії в поживне середовище додають мелясний розчин і мінеральні солі. Дріжджі вирощують за такою схемою: чотири пробірки – чотири колби об'ємом 100 см³ – чотири колби Пастера – дві колби Карлсберга; отримуючи в кожній стадії об'єм дріжджової розводки, в 10 разів більший, ніж в попередній. Накопичення дріжджів здійснюють при температурі 26-30°C, без аерації. Тривалість кожної стадії 16-24 год. На останній лабораторній стадії отримують близько 7 л дріжджової розводки [33].

ДР2 – підготовка післяспиртової барди.

Барда, що надходить зі спиртового виробництва, перед використанням в якості компоненту поживного середовища проходить вхідний контроль з метою визначення органолептичних та фізико-хімічних показників, після чого

допускається до технологічної обробки при приготуванні поживних середовищ для різних стадій культивування дріжджів.

ДР3 – приготування поживного середовища.

Мінеральне живлення (азотне та фосфорне) поживного середовища завантажують до відповідних кожному з компонентів збірників сировини, де вони зберігаються та поступово передаються на автоматичні ваги. Після точного виміру кількості компонентів сировину засипають у змішувач. Замість нагрівають до 80-90°C і витримують при температурі 20-30 хвилин. Стерилізація поживного середовища здійснюють при температурі 128°C та $\Delta=93$, потім охолоджують водою до 30-32°C. Охолоджене простерилізоване середовище далі надходить в інокулятори та ферментатори.

ДР4 – підготовка стерильного повітря.

Атмосферне повітря для аерації проходить крізь фільтр грубого очищення, який слугує для очищення повітря від механічних забруднень, та потрапляє до компресора, в якому стискається та перекачується до масляного фільтру, де доочищується від зважених частинок. Далі потік повітря піддається стерилізації гострою парою при температурі 150°C у теплообміннику для стерилізації повітря. Після стерилізації повітря подають на охолодження водою у теплообмінник для охолодження повітря. Далі охолоджене та стерильне повітря поступає до головного фільтра. Очищення повітря на вході в інокулятори та ферментери додатково очищується в індивідуальних фільтрах.

ДР5 – приготування піногасника.

Під час отримання хлібопекарських дріжджів до засіяного середовища додають піногасник у вигляді емульсії в кількості 0,15 г/дм³. Стерилізацію піногасника здійснюють при температурі 110°C та $\Delta=70$.

ДР6 – підготовка стабілізатора росту.

В якості стабілізатора росту дріжджів використовують бетаїн в кількості 1% до сухих речовин дріжджів, який пройшов стерилізацію при температурі 110°C та $\Delta=70$.

ДР7 – підготовка повітря.

Підготовка повітря з навколишнього середовища для потреб сушіння проходить у два етапи: повітря надходить в повітряний фільтр, де очищується від сторонніх домішок, та подається до парового калорифера, де підігривається і стерилізується паром за температури 120°C. Підготоване повітря надходить до розпилюючої сушарки.

ЗВ1 – очистка відпрацьованого повітря.

Відпрацьоване повітря з інокуляторів і ферментера проходить через індивідуальні фільтри, де очищується і потім скидається в навколишнє середовище.

ЗВ2 – утилізація фільтрату.

Фільтрат, який утворився на стадії сепарування культуральної рідини, інактивують та зливають у каналізацію.

ЗВ3 – очистка повітря.

Відпрацьоване в процесі сушки повітря перекачується у циклони, де відбувається відділення часток сухого продукту від повітря. Внаслідок сили інерції (відцентрової сили) частинки пилу виносяться з потоку і осідають на стінках апарату, потім захоплюються вторинним потоком і потрапляють в нижню частину, де потім виводяться. Очищений від пилу газовий потік потім рухається від низу до верху і виводиться з циклону через вихлопну трубу в атмосферу.

ПМВ1 пакування, маркування, відвантаження пресованих хлібопекарських дріжджів.

Сушені дріжджі упаковуються в пакети з полімерних матеріалів — 10-2000 г або в паперові мішки по 10-25 кг чи ящики, вистелені пергаментом, по 10-20 кг. Сушені дріжджі дуже гігроскопічні. Вони швидко втрачають свою активність під дією кисню повітря і вологи. Тому їх зберігають у сухих, таких, що мають вентиляцію, приміщеннях при температурі, не вищій 15°C. Перед використанням сушені дріжджі необхідно активувати, попередньо розмочивши їх у воді з метою регідратації: 1 кг дріжджів рекомендується замочувати в шестикратній кількості теплої води [15].

РОЗДІЛ 2. УМОВИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Схема дослідження

Основні дослідження було розділено на два етапи.

На першому етапі досліджувались дріжджі, отримані лабораторним способом. Для досягнення мети дослідження на цьому етапі було розроблено блок-схему з основними процесами (рис. 2.1).



Рис. 2.1. Схема дослідження лабораторного одержання штамів хлібопекарських дріжджів

На другому етапі роботи досліджувались промислово отримані дріжджі. А саме, їх підйомна сила у процесі виготовлення тіста.

2.2. Поживні середовища та їх компоненти

Потреба мікроорганізмів у поживних речовинах середовища є доволі різноманітною. Окремі види дріжджових штамів потребують приготування спеціальних середовищ. На сьогоднішній день, частину середовищ готують безпосередньо в лабораторіях перед засівом [35]. Проте з кожним роком з'являються нові середовища промислового виробництва (dry). Ці середовища мають доволі тривалий час зберігання та стандартний склад. Класифікація поживних середовищ здійснюється за їх консистенцією. Відповідно їх поділяють на напіврідкі, щільні (тверді), і рідкі. Напіврідкі та щільні середовища готуються з рідких, із додаванням відповідно 0,3-0,7 % і 1,5- 2,0 % агару [3,31].

Джерела живлення, необхідні для культивування мікроорганізмів, можна розділити на наступні групи:

- вуглеводи;
- макроелементи (P, K, S, Mg);
- мікроелементи (Zn, Mn, Ca, Fe, та ін.);
- амінокислоти;
- вітаміни.

Джерелами вуглецю виступають моносахариди (D-глюкоза, D-маноза, D-фруктоза, D-галактоза), дисахариди сахароза і мальтоза та трисахарид мальтотріоза. Вуглець використовується для синтезу клітинних компонентів, дихання і утворення вторинних метаболітів.

Для культивування дріжджів основним джерелом вуглеводів слугує бурякова меляса. Вона є продуктом переробки цукрового буряка. У своєму

складі містить воду, аміді і від 20% до 60 % вуглеводів. Концентрація цукрів залежить від потреб та контролюється розведенням.

Суттєвий вплив на ріст мікроорганізмів мають фактори росту, а саме: вітаміни, пурини, піримідини, амінокислоти, які додають в поживне середовище у вигляді чистих сполук або у складі дріжджових екстрактів.

Дріжджовий екстракт виготовляється шляхом переробки пивних або пекарських дріжджів. Кінцевий склад продукту більшою мірою складається з білкових сполук – амінокислот [35].

Фосфор входить до складу нуклеїнових кислот, АТФ, фосфоліпідів, полімерів клітинної стінки клітин дріжджів, мембран органоїдів клітин. Брак фосфору уповільнює процес бродіння і розмноження клітин дріжджів. Калій активує близько 40 різних ферментів, в тому числі оксидази і дегідрогенази. Іони калію виконують роль не тільки коферментів, але також входять до складу деяких структур клітини, зокрема, рибосом. Іони K^+ беруть участь у транспорті в клітини ортофосфату, що грає велику роль в енергетичному обміні дріжджів.

Окрім джерел вуглецю та азоту і факторів росту, дріжджова клітина має потребу у сірці. Встановлено, що при нестачі цього компонента в середовищі культивування спостерігається зниження дихальної активності клітин дріжджів. Сірка засвоюється дріжджами з неорганічних сульфатів, з сірковмісних амінокислот. Всі ці компоненти вводилися у склад живильного середовища в доступній для мікроорганізмів формі у певному співвідношенні.

Для стандартного культивування дріжджів використовують насичене середовище, яке постачає всі поживні речовини, необхідні клітинам для росту. Одним з базових є середовище YPD, яке є простим і недорогим у приготуванні. «Y» у YPD означає дріжджовий екстракт, який містить водорозчинні сполуки, що утворюються, коли дріжджі змушені самоперетравлюватися. Буква «P» означає пептон, суміш пептидів і амінокислот, отриману шляхом перетравлення тваринного білка за допомогою протеаз. Буква «D» означає декстрозу або глюкозу, яка є улюбленим джерелом Карбону в дріжджах.

Оскільки YPD складається в основному з сирих екстрактів, його склад може відрізнятись. Ця варіація рідко є проблемою, оскільки YPD містить більш, ніж достатньо необхідних поживних речовин для задоволення метаболічних потреб клітин. Однак багато експериментів вимагають середовища з певним складом. Щоб задовольнити цю потребу було розроблено різноманітні синтетичні середовища, компонентами яких можна маніпулювати відповідно до потреб експерименту [33].

Дріжджі можна вирощувати в рідких культурах або на поверхні пластин, що містять тверді середовища. Агар зазвичай використовують для затвердіння рідких ростових середовищ під час підготовки чашок. Штами зазвичай зберігаються на чашках з агаром для звичайного використання. Клітини ростуть колоніями на пластинах. Клітини в колонії генетично дуже схожі, якщо не ідентичні, оскільки вони походять від однієї клітини-попередника. Більшість штамів дріжджів можна зберігати на пластинах у холодильнику протягом кількох місяців з мінімальною втратою життєздатності.

Для культивування дріжджів у роботі було використано 3 середовища з таким складом:

1. Середовище YPD: 2% сахароза, 1,5% пептон, 2% агар, 1% УЕ (дріжджовий екстракт), дистильована вода – 95 мл, рН 5-5,5.
2. Середовище мелясне 7,5%: вода – 2700 мл, меляса – 772 мл, аміачна вода – 30,5 мл, H_3PO_4 – 7,25 мл, HNO_3 – доведення рН, піногасник – 0,25мл, MgSO_4 – 2,6 мл, ZnSO_4 – 634 мкрл, CuSO_4 – 127 мкрл, вітаміни 0,5 мл.
3. Середовище мелясне 4% : вода – 3042 мл, меляса – 413 мл, аміачна вода – 19,3 мл, H_3PO_4 – 3,8 мл, HNO_3 – доведення рН, піногасник – 0,25 мл, MgSO_4 – 2,1 мл, ZnSO_4 – 534 мкрл, CuSO_4 – 107 мкрл, вітаміни– 0,5 мл.

Перше середовище використовувалось виключно для культивування дріжджів на чашках Петрі. На решті етапів у процес були введенні виключно мелясні середовища.

Перед початком роботи кожне середовище проходило етап стерилізації та охолодження.

Для стерилізації необхідно було створити умови для загибелі мікрофлори.

Процес термічної стерилізації проводився в автоклаві при 120°C протягом 30 хв, який можна розділити на такі етапи:

- середовище нагрівали до температури стерилізації – 120°C і тиску 1 бар;
- витримували при цій температурі впродовж 30 хв, що забезпечує загибель всіх мікроорганізмів,
- середовище охолоджували до температури культивування 28-32 °C.

2.3. Підготовка посівного матеріалу та накопичення біомаси

2.3.1. Посів на чашки Петрі

Для досліджень було використано 4 види сухих хлібопекарських дріжджів (рис. 2.2):

- 1 зразок – «Львівські дріжджі»;
- 2 зразок – «Dr.Oetker»;
- 3 зразок – «Саф-Момент»;
- 4 зразок – «Vitana».

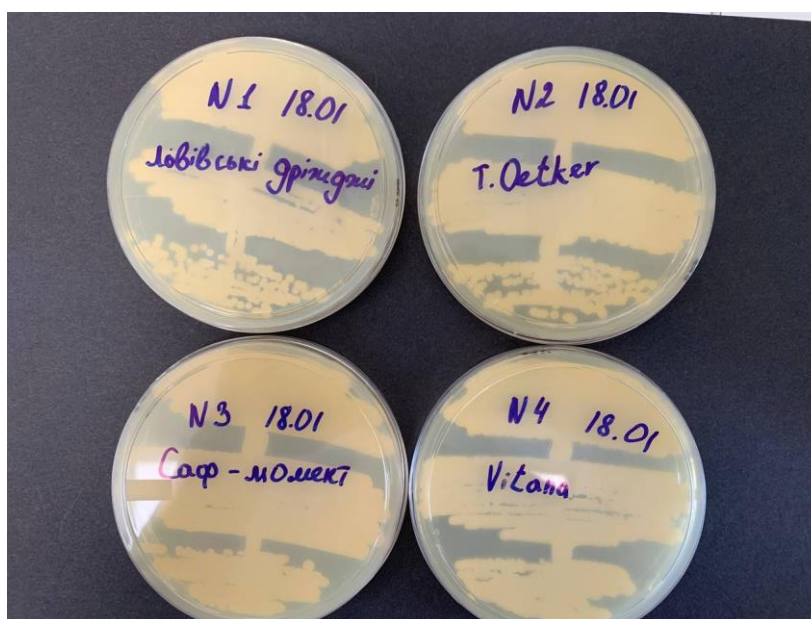


Рис. 2.2. Досліджувані зразки

Для накопичення біомаси та отримання посівного матеріалу було використано тверде поживне середовище YPD (рис. 2.3 а, б) (1,5% пептон, 2% сахароза, 1% дріжджовий екстракт, 2% агар), яке у ламінарному боксі розлили по чашках Петрі та залишили до повного застигання середовища.



а)

б)

Рис. 2.3. Розливання середовища YPD по чашках Петрі

Після цього розпочалось приготування дріжджової суспензії. Дріжджі розчинили у невеликій кількості стерильної води у мікропробірці та провортексували.

Готову суспензію висіяли на чашку:

- 2-3 краплі дріжджової суспензії капнули на поверхню середовища;
- взяли бактеріологічну петлю та обпалили її у верхньому шарі полум'я пальника;
- зробили розсів суспензії по всій поверхні чашки;
- повторно обпалили петлю у полум'ї;
- поставили засіяні чашки у термостат при температурі 30°C на 48 годин.

2.3.2. Вирощення дріжджів у рідкому середовищі

На цьому етапі було використано 2 види рідкого мелясного середовища з вмістом цукру 4% та 7,5%.

У колби наливали 200 мл поживного середовища та стерилізували. Вже у стерилізоване середовище додавали 29 мкл вітамінів та перемішували. З колби з вітамінами відбирали піпетдозатором 4 мл середовища та переливали в стерильну пробірку. Весь процес відбувається в ламінарному боксі або біля пальника, щоб уникнути зараження небажаними мікроорганізмами.

Після цього мікробіологічну петлю пропалювали у вогні пальника, та відбирали 2-3 колонії дріжджів для засіву в пробірку.

Пробірку, в яку додали колонії, вортексували та ставили в шейкер, де відбувалось постійне перемішування, на 24 години при температурі 30 °C.

По завершенню 24 годин пробірки з термостату діставали та пересіювали біомасу в колби, в які на першому етапі було додано вітаміни.

Пересіяні колби знову поміщали у шейкер на 24 години при температурі 30 °C.

2.3.3. Скринінги росту

Відразу після того, як у колби було пересіяно біомасу відбирався зразок на визначення OD.

Оптична густина (OD) — це кількість світла, поглиненого матеріалом чи зразком за допомогою фотоплівки або спектрофотометра.

OD визначається як негативний логарифм пропускання світла через зразок. Звідси випливає, що чим більше світла поглинає зразок, тим нижча його пропускну здатність і вища OD.

У біології OD використовується для вимірювання кількості клітин у зразку. Клітини поглинають світло, і чим щільніший зразок, тим вища його OD. Це допомагає прослідкувати криву росту мікроорганізмів, та спостерігати за фазами росту клітин. [33]

Вимірювання OD здійснювались на спектрофотометрі Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (рис. 2.4) у 20-кратному розведенні. Для цього у кюветку відбирали 50 мкл середовища з культурою дріжджів та додавали 950 мкл дистильованої води. Вимірювали оптичну густину зразків при довжині хвиль 600 нм. Контрольним зразком для вимірювань був дистиллят.



Рис. 2.4. Спектрофотометр Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer

2.4. Визначення рН в культуральному середовищі

Вимірювання значень рН зразків проводили за допомогою рН-метра METTLER TOLEDO S230-KIT (рис. 2.5).

Основний принцип дії рН-метра полягає у вимірюванні потенціалу водневого іону (рН) у розчині.

Процедура вимірювання рН за допомогою рН-метра зазвичай включає такі кроки: підготовка рН-метра, калібрування рН-метра та безпосереднє вимірювання рН. Після вимірювання електрод необхідно промити дистильованою водою.

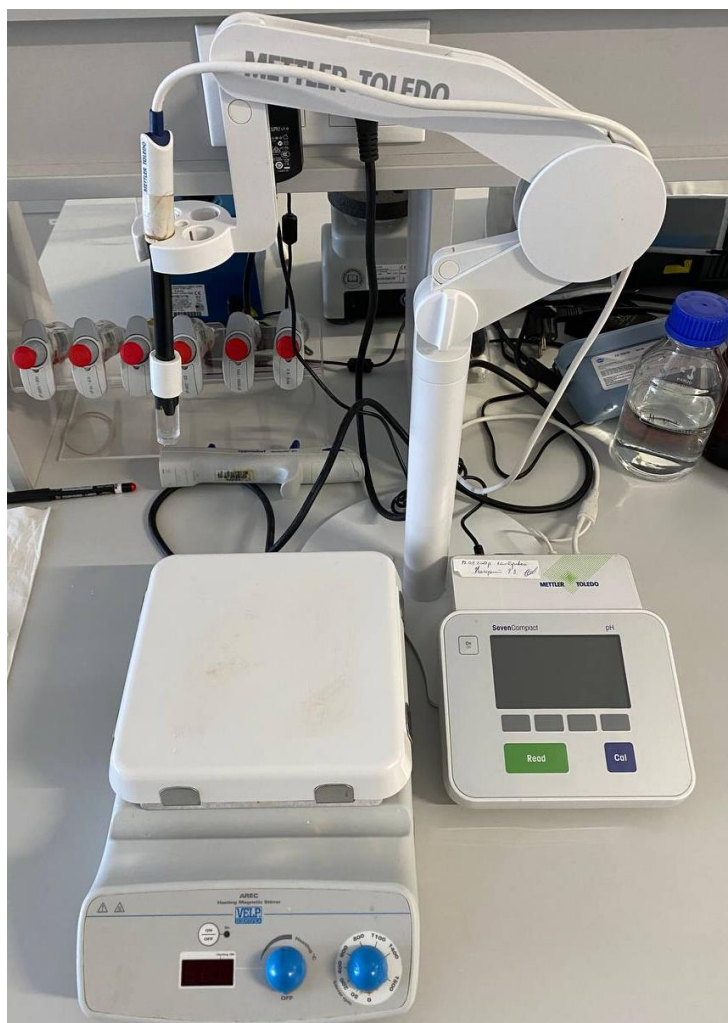


Рис. 2.5. рН-метр METTLER TOLEDO S230-KIT

2.5. Формольне титрування

Для визначення кількості атомів вільного азоту в середовищі використовується метод формольного титрування. У випадку з культивуванням дріжджів чим вище формольне число, тим менша кількість біомаси мікроорганізмів у поживному середовищі.

Для проведення формольного титрування використовують: 10 мл культуральної рідини, 90 мл води, формалін (водний розчин формальдегіду, 37%) – 5 мл, стандартний розчин натрій гідроксиду (NaOH, 0,1 М) до зміни кольору, фенолфталеїн – 2 краплі, скляний посуд (колби, бюретки, мірні циліндри).

Зразок, розчиняється у 90 мл дистильованої води. Розчин повинен бути прозорим і без домішок. До підготовленого зразка додають 1-2 краплі фенолфталеїну і постійно перемішуючи додають розчин NaOH до появи слабо-рожевого кольору який не зникає. Після цього дадають 5 мл формаліну, в результаті чого рожеве забарвлення зникає.

Далі до реакційної суміші поступово додають розчин NaOH з бюретки, постійно помішуючи суміш. Титрування проводиться до досягнення слабо-рожевого забарвлення. Об'єм NaOH, витрачений на титрування, записується.

2.6. Культивування у BioFlex

BioFlex – це маленький біореактор, призначений для культивування мікроорганізмів у лабораторних умовах (рис. 2.6). Він підтримує температуру культивування, забезпечує перемішування та аерацію. В залежності від потреб, також здатен підтримувати рН та дозувати елементи культурального середовища.



Рис. 2.6. Ферментер BioFlex

2.6.1. Підготовка до культивування

У досліді використовувалась безпроточна ферментація, тобто ніякі речовини протягом культивування дріжджів не додавались.

Для цього перед початком ферментації готувалось 7,5% мелясне середовище. Склад подано у таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Склад поживного середовище для ферментації дріжджів

Загальний об'єм	3500 мл
Вода	2700 мл
Меляса	772,0588 мл
Аміачна вода	30,50109 мл
H_3PO_4	7,244009 мл
HNO_3	До потрібного pH

Продовження таблиці 2.1

Піногасник	250 мкл
Mg ₂ SO ₄ (розч.)	2,536232 мл
ZnSO ₄ (розч.)	634,058 мкл
CuSO ₄ (розч.)	126.8116 мкл
Вітаміни (після автоклавування)	507,2464 мкл

Приготоване середовище разом з ємністю для культивування автоклаувались протягом 40 хвилин та остигали до 30 °С .

Після остигання ємність під'єднувалась до блоку живлення, підключалась циркуляція повітря, рН-сенсор, датчик температури та водяна сорочка, яка підтримує температуру протягом культивування. Після під'єднання у біореактор додавалися вітаміни та вирощена в колбах культура дріжджів. Ферментація протікала 24 год за температури 30 °С. Початкове рН у всіх зразках становило 5,5.

2.6.2. Сепарація вирощених дріжджів

По завершенню ферментації вирощену біомасу відділяли від залишків поживного середовища та промивали водою.

Весь об'єм культуральної рідини розливали по баночках об'ємом до 1 л та центрифугували при 4600 об./хв. 2 хвилини (рис. 2.7). Верхню фракцію рідини зливали та додавали у банку стерильної води та розмішали з дріжджами. Промивку водою проводили двічі.

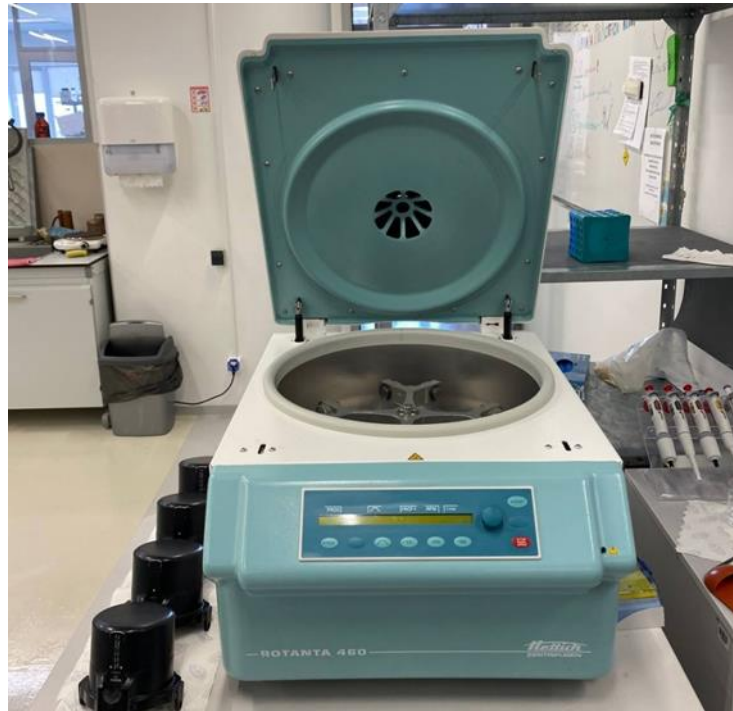


Рис. 2.7. Центрифуга Rotanta 260

Після цього дріжджі розводили в невеликій кількості води та визначали АСБ (абсолютно суху біомасу). Для цього спочатку визначали масу (m) та вологу (w) отриманої суспензії (приклад суспензії представлено на рис. 2.8).

Після проводили розрахунок за формулою:

$$\text{АСБ} = \frac{100 - w}{m} \times 100\%$$

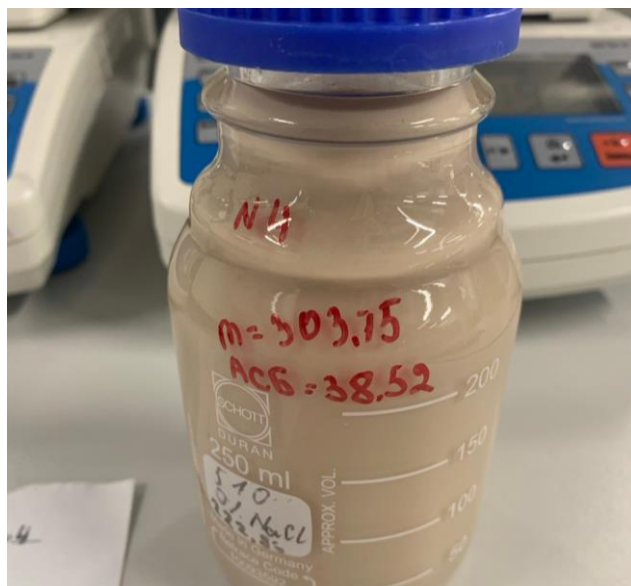


Рис 2.8. Суспензія дріжджів

Отриману суспензію зневоднювали за допомогою вакуум-фільтра (рис. 2.9 а, б). У ємності фільтра кладеться фільтрувальний папір та заливається суспензія. Після чого створюється вакуум, який відсмоктує всю зайву вологу.



Рис. 2.9: а) Вакуум-фільтр; б) зразок дріжджів в процесі вакуум-фільтрації

У результаті отримуються брусочки дріжджів з вологістю 60-75% (приклад на рис. 2.10), які є готовим продуктом. Час вакуум-фільтрації залежить від кількості залитої суспензії дріжджів та кількості шарів фільтрувального паперу. Оптимальна кількість шарів паперу дорівнює 3, а маса суспензії 200 мл. Орієнтовний час фільтрації одного бруска дріжджів дорівнює 5-7 хв.

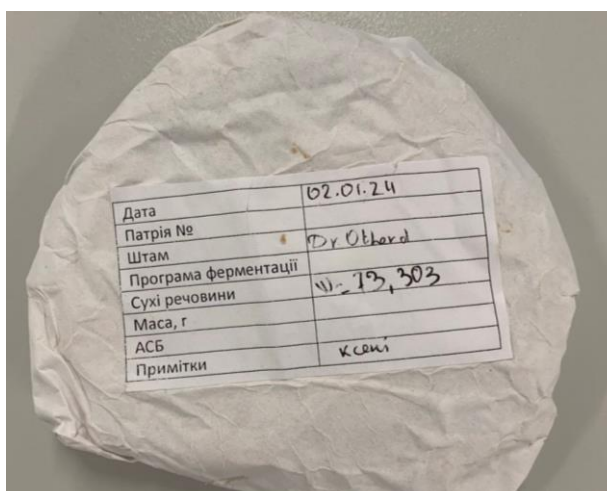


Рис. 2.10. Приклад отриманого брусочка дріжджів

2.7. Ферментограф YeastFors

YeastForce (рис. 2.11) – це прилад, призначений для визначення потужності розпушування, об'єму тіста, утримання газу та загального об'єму газу в заготовках тіста, а також вимірювання тиску CO_2 [мбар] протягом певного часу (зазвичай для найбільш точного результату це 2 години). Цей метод дуже добре співвідноситься з акредитованими методами асоціації VН Berlin - Дослідницького інституту хлібопекарських дріжджів.

Крім того, YeastForce може визначати газотримувальну здатність у тісті зразків тіста для розстоювання (з дріжджами, харчовою содою або кислим тістом) як кінетику концентрації газу CO_2 .

Ключові показники тіста, важливі для результату випікання, такі як: час розстоювання (час до досягнення максимального об'єму бродіння зразка тіста) і утримання газу (коефіцієнт [%]) та частку газу в тісті. [34]



Рис. 2.11. Ферментограф YeastFors

2.7.1. Приготування зразка тіста

Спочатку на технічній вазі зважували певну кількість дріжджів та переміщали цю наважку в сталеву ємність тістомісильної машини. З термостату, в якому підтримується постійна температура 35°C, виймали пшеничне борошно та 0,25% розчин кухонної солі чи води та інші компоненти (відповідно до рецептури). За допомогою мірного циліндра (на 100 мл.) вимірювали певний об'єм розчину солі чи води, переміщали в ємність тістомісильної машини та розмішували до повного розчинення наважки дріжджів. На технічних вагах зважували також і інші необхідні компоненти та певну кількість пшеничного борошна (в хімічному стакані на 2 л) і висипали у сталеву ємність.

Підключали тістомісильну машину до електромережі, вибирали режим перемішування “1” за допомогою круглого перемикача та приводили в дію. Час перемішування - 1 хвилина. Після цього потрібно було зупинити перемішування та за допомогою ложки зішкрябати всі залишки борошна чи тіста, що залишились на стінках металевого чану тістомісильної машини. Запустили перемішування знову, проте збільшили режим до “3” чи “4” на 4 хвилини. Загальний час перемішування - 5 хвилин. Після закінчення перемішування знову зішкрябали залишки тіста зі стінок та мішалки, об'єднали їх з отриманим тістом та місили на протязі 1 хвилини. Від отриманого тіста (приблизно 440 г) необхідно було відірвати шматок та на технічних вагах зважити 43,75 г. Отриману наважку тіста потрібно місити до досягнення температури тіста на рівні 30°C.

Для досліджень було взято 2 види тіста: стандартне та здобне з великим вмістом цукру і жиру.

Рецептура стандартного тіста:

- 280 г пшеничного борошна (вищий гатунок);
- 160 мл 2,5% розчину кухонної солі (розчин готують на воді з водогону);

- 3,64 г пресованих дріжджів, або 1,52 сухих.

Рецептура здобного тіста (15% цукру та 20% жиру):

- 280 г пшеничного борошна (вищий гатунок);
- 120 мл води (вода з водогону);
- 4 г солі;
- 42 г цукру;
- 54 г маргарину 50%;
- 5 г пресованих дріжджів, або 2,5 сухих.

2.7.2. Підготовка до вимірювання газоутворення за допомогою ферментографа YeastFors

Перший етап. Потрібно набрати необхідну кількість води (стілки баночки мають зануритись у воду) та включити водяну баню для прогріву до температури 30-35°C.

Другий етап. Підключення сенсору, під'єднання до блоку живлення та перевірка контакту. Головки приладу потрібно вмикати заздалегідь для обдуву їх сенсорів повітрям. Це може займати від 5 хв. до 1 год.

Третій етап. Підготовка до роботи. На комп'ютері запустити програму BlueSens YeastForce Monitor. У вкладці “Selection” вибрати програму вимірювання газоутворення тіста відповідно до завдання та рецептури тіста. У відповідному вікні написати коментар, що складається з: дати аналізу, назви штаму мікроорганізму, програми ферментації, часу вимірювання та іншої додаткової інформації за необхідності. Попередньо прогріту на водяній бані банку зсередини змастити олією та помістити всередину тісто (43,75 г) з температурою 30 °C. Закріпити сенсор на баночці за допомогою залізних зажимів та перевірити герметичність з'єднання банки та сенсору.

Поставити баночку разом з сенсором у водяну баню та запустити вимірювання за допомогою відповідної кнопки. Вимірювання буде тривати протягом 2 год.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Вплив вмісту цукрів в середовищі на криву росту дріжджів

Період, коли дріжджові клітини, висіяні в середовище, ще не почали рости, називається лаг-фазою.

Після лаг-фази клітини починають рости, збільшуються в розмірах і утворюють бруньки. Через певний проміжок часу, який називається періодом генерації, кількість і біомаса клітин подвоюється. Протягом цього періоду розмноження дріжджів відбувається з постійною швидкістю. При цьому кількість і маса клітин збільшується в геометричній прогресії. Період швидкого росту клітин називають логарифмічним або експоненціальним періодом, оскільки рівняння, що описує питому швидкість росту культури, використовує часовий вимір як показник степеня (експоненту). Якщо кількість клітин або біомасу виразити логарифмом, то часова залежність збільшення маси клітин буде представлена прямою лінією. У цей період клітини найбільш активні, молоді та швидко брунькуються.

Коли середовище виснажується, розмноження дріжджів сповільнюється і проліферація клітин зменшується. Це фаза уповільнення, також відома як фаза негативного прискорення росту. При цьому питома швидкість розмноження (μ) поступово зменшується.

Коли кількість поживних речовин у середовищі зменшується, ріст дріжджів повністю зупиняється і переходить у стаціонарну фазу. Кількість клітин і біомаса залишаються незмінними. Вся клітинна популяція перебуває на завершальній стадії розвитку. [24]

Для аналізу кривої росту протягом 24 годин було проведено вимір ОД у культуральній рідині при двадцятикратному розведенні за допомогою спектрофотометра при довжині хвиль 600 нм. Для порівняння було використано два середовища з різним вмістом цукрів 4% та 7,5%. Результати були оформлені у графіки (рис. 3.1, 3.2.).

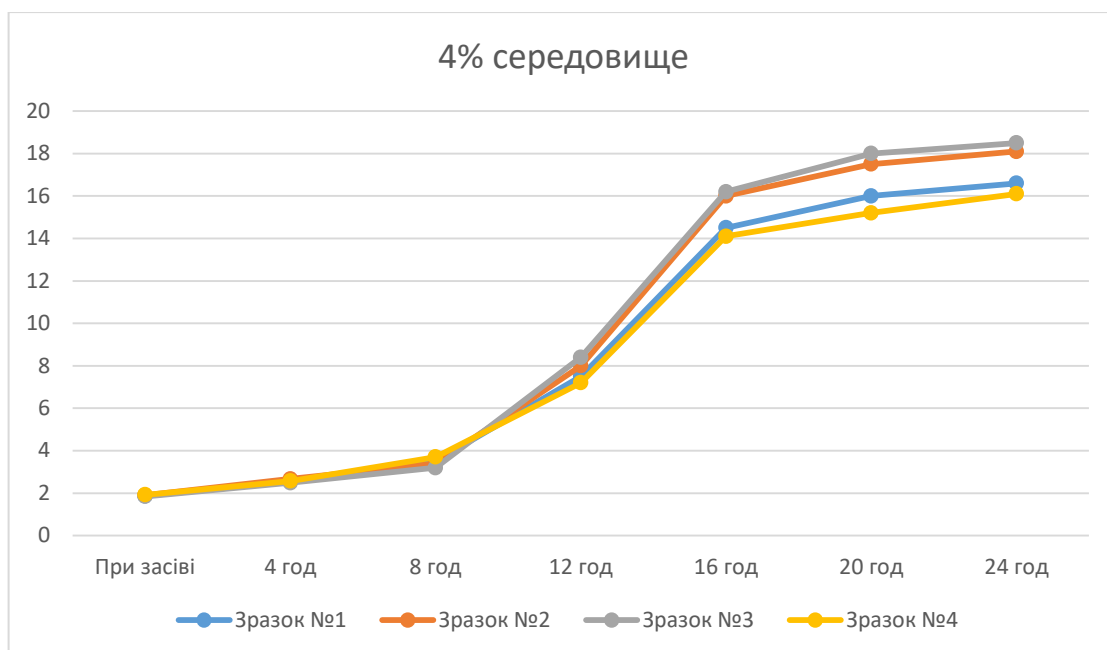


Рис. 3.1. Крива росту дріжджів на 4% середовищі

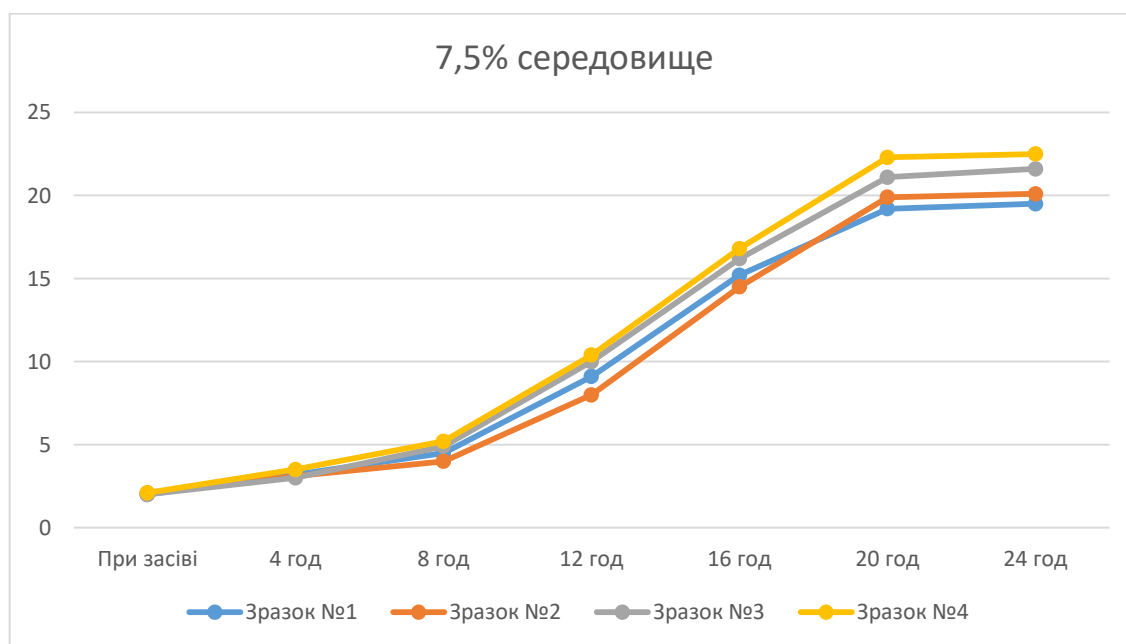


Рис. 3.2. Крива росту дріжджів на 7,5% середовищі

На початку засіву у всіх колбах було приблизно однакове ОД і коливалось у межах 2. Порівнявши графіки можна дійти висновку, що найінтенсивніший час росту дріжджів припав на період з 8 по 20 годину. У цій межі можна побачити великий стрибок у кількості клітин.

Співставивши два графіки можна дійти висновку, що більш інтенсивно дріжджі наростили біомасу на середовищі з більшим вмістом цукру. На 7,5%

середовищі ОД на кінець експерименту сягало 22,5 у найкращого зразка та 19,5– у гіршого. В той же час у середовищі з вмістом цукру 4% максимальний рівень ОД у найкращого зразка досяг 18,5, а у гіршого – 16,1.

На основі отриманих даних було прийняте рішення у подальшому для культивування використовувати лише 7,5% середовище.

3.2. Аналіз виходу ферментації та фізико-хімічних показників культуральної рідини

Визначенні фізико-хімічних показників культуральної рідини

У дослідженнях використовувався метод без проточної ферментації, при якому в культуральну рідину нічого не додають. В цьому випадку перед початком всі елементи даються з надлишком. Якщо умови будуть не підходящими і надлишок цукрів буде завеликим, почнеться процес бродіння, в результаті якого приріст біомаси буде мінімальним, а кількість спирту в середовищі буде сильно завищена. З цього і випливає, що при відсутності інтенсивного росту дріжджів не будуть засвоюватись атоми вільного азоту, які ми перевіряємо формольним титруванням.

Після завершення ферментації проводилось визначення вмісту цукру та спирту і формольне число в культуральній рідині. Результати оформлені в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1

Порівняння вмісту цукру, спиту та формольного числа по завершенню культивування

№ зразка	Вміст цукру, %	Вміст спирту, %	Формольне число
Зразок №1	6	18.5	7
Зразок №2	5	10	5.1
Зразок №3	6	18	6
Зразок №4	5	11	6

Згідно з результатами таблиці, усі зразки здійснили приріст біомаси. Зразок №2 показав найкращі результати по усіх показниках, що свідчить про засвоєння складників середовища та відсутність процесу бродіння. Найгірші показники спостерігаються у зразка №1.

Аналіз виходу ферментації

Кінцевим етапом визначення продуктивності вирощеного зразка вираховується вихід ферментації на основі отриманого значення АСБ та маси цукрів. Для обрахунку виходу використовується формула:

$$\text{Вихід} = \frac{\text{АСБ}}{m_{\text{цукру}}} \times 100\%$$

Щоб знайти масу цукру, ми кількість меляси, яку використали для приготування середовища множимо на 0,34. Це значення може різнитись в залежності від вмісту цукру в мелясі. У всіх середовищах вміст цукру становив 262,49 г. Кількість АСБ у кожному зразку та розрахунок виходу ферментації оформлено в таблиці 3.2.

Оптимальним значенням виходу для ферментації є 13-16%. Значення, вищі оптимальних свідчать про хороший вихід та відповідність умов даному зразку дріжджів. Значення, нижчі оптимуму свідчать про погані умови для культивування.

Таблиця 3.2

Аналіз виходу ферментації

№ зразка	Кількість АСБ, г	Вихід ферментації, %
Зразок №1	31,82	12,1
Зразок №2	42,43	16,2
Зразок №3	31	11,8
Зразок №4	40,55	15,45

Відповідно до таблиці, можна зробити висновок, що найкращий вихід ферментації мав зразок №2, найгірший – зразок №3.

3.3. Аналіз значень рН та розчиненого кисню у процесі культивування дріжджів

Під час процесу без проточної ферментації до маленького біореактору було під'єднано датчики кисню (що показував рівень розчиненого O_2 в культуральній рідині) та рівня рН середовища.

Рівень розчиненого кисню вказує на етапи інтенсивного росту: коли його рівень падає, це свідчить про активне нарощення біомаси, коли ж рівень підіймається – відбувається процес бродіння, побічним продуктом якого є утворення O_2 .

Зниження рівня рН в середовищі пов'язано з тим, що під час нарощення біомаси дріжджі закиснюють середовище побічними продуктами своєї життєдіяльності, коли ж мікроорганізми переходять до утворення спирту – середовище залужується (рис. 3.3).

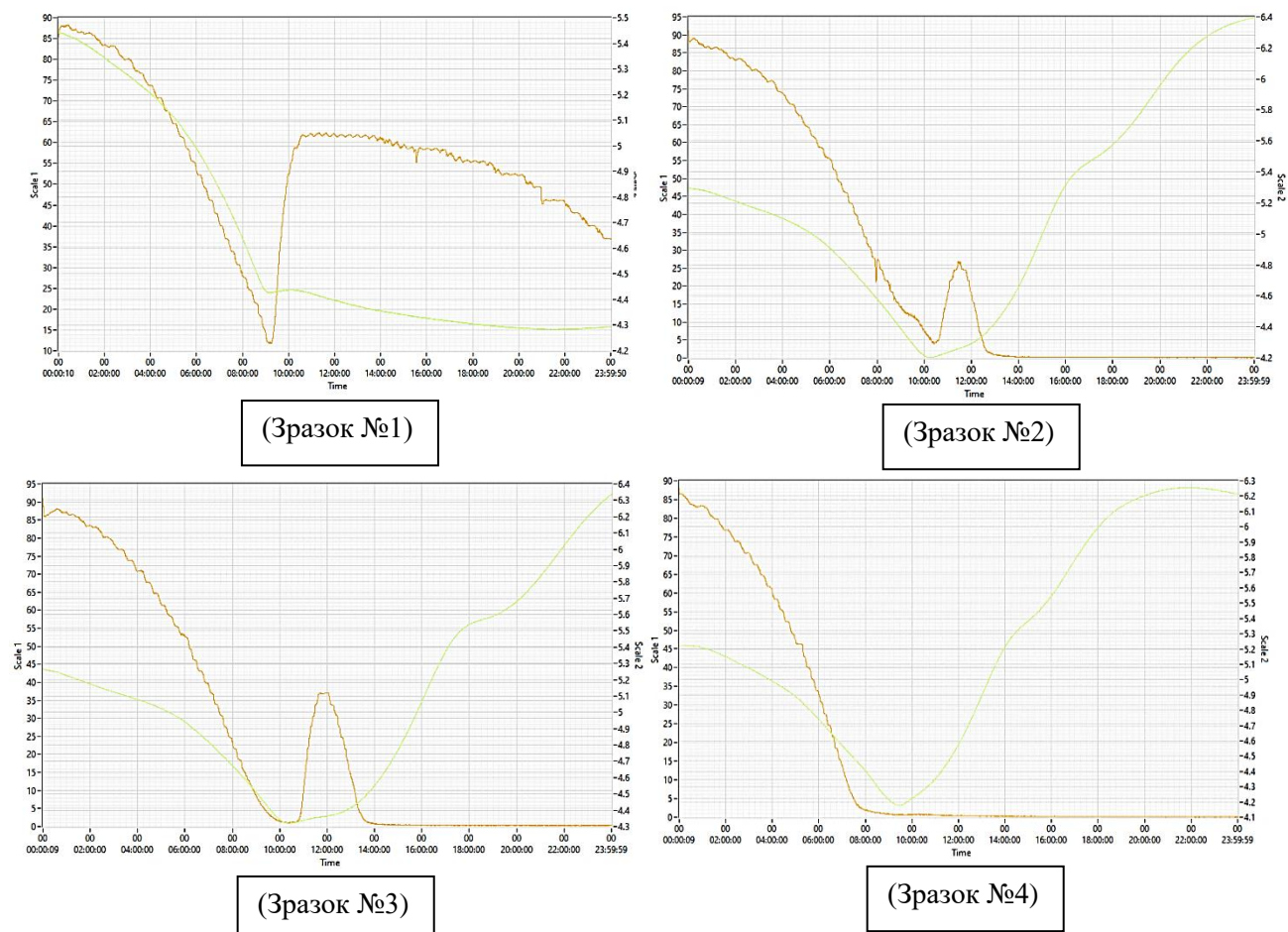


Рис. 3.3. Графіки рівня рН та розчиненого кисню в ході ферментації

Рівень кисню на графіках відображається оранжевим кольором, шкала вимірювання для нього позначається як Scale 1. Рівень рН відображається зеленим кольором, шкала вимірювання для нього позначається як Scale 2. Шкала Time вказує на часовий проміжок ферментації.

На графіках проглядається залежність рівня рН від рівня розчиненого кисню: при зниженні рівня розчиненого кисню знижується рівень рН, що вказує на активний ріст мікроорганізмів у цей період.

Отже, можна зробити висновок що найінтенсивніший ріст дріжджів всіх зразків відбувався з першої до десятої години. Після 10-ої години у 1-, 3- та 4-ому зразках відбувся процес бродіння, який у 3- та 4-ому зразку швидко припинився, а у зразку № 1 продовжувався з високою інтенсивністю.

3.4. Визначення інтенсивності газоутворення дріжджів, одержаних лабораторним та промисловим шляхом

Всі дослідження проводились на двох видах тіста: стандартному та здобному. Крім цього, порівнювались лабораторно та промислово отримані зразки. У якості промислово одержаних зразків виступали звичайні пакетовані дріжджі, які додавались у тісто. У якості лабораторних зразків використовувались дріжджі, вирощені в процесі проведення дослідної роботи.

Результати досліджень зразка №1 (рис. 3.4.) показують, що вихід CO_2 у здобному тісті при лабораторному вирощенні дріжджів дорівнює 17,612, а у промислово отриманих – 17,756. У стандартному тісті: у лабораторних – 63,017, у промислових – 40,937. Графік газоутворення у тіста, виготовленого на промислових дріжджах відрізняється від решти; інтенсивне газоутворення відбулось лише на початку досліду і в подальшому майже не відбувалось. Це може свідчити про те, що дріжджі не отримали необхідні умови або була невелика кількість активних дріжджів, які б могли підтримувати цей процес стабільно.

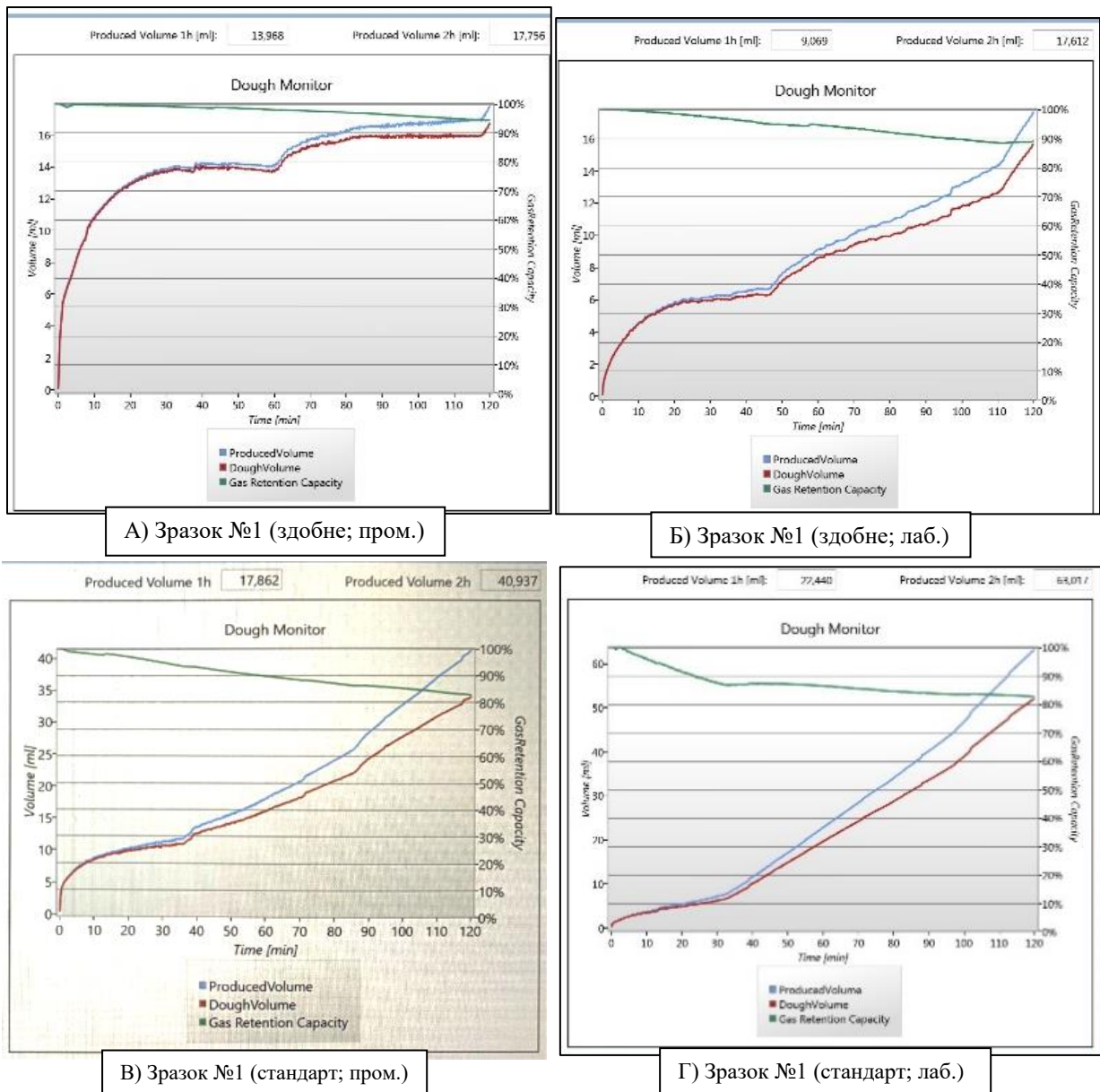
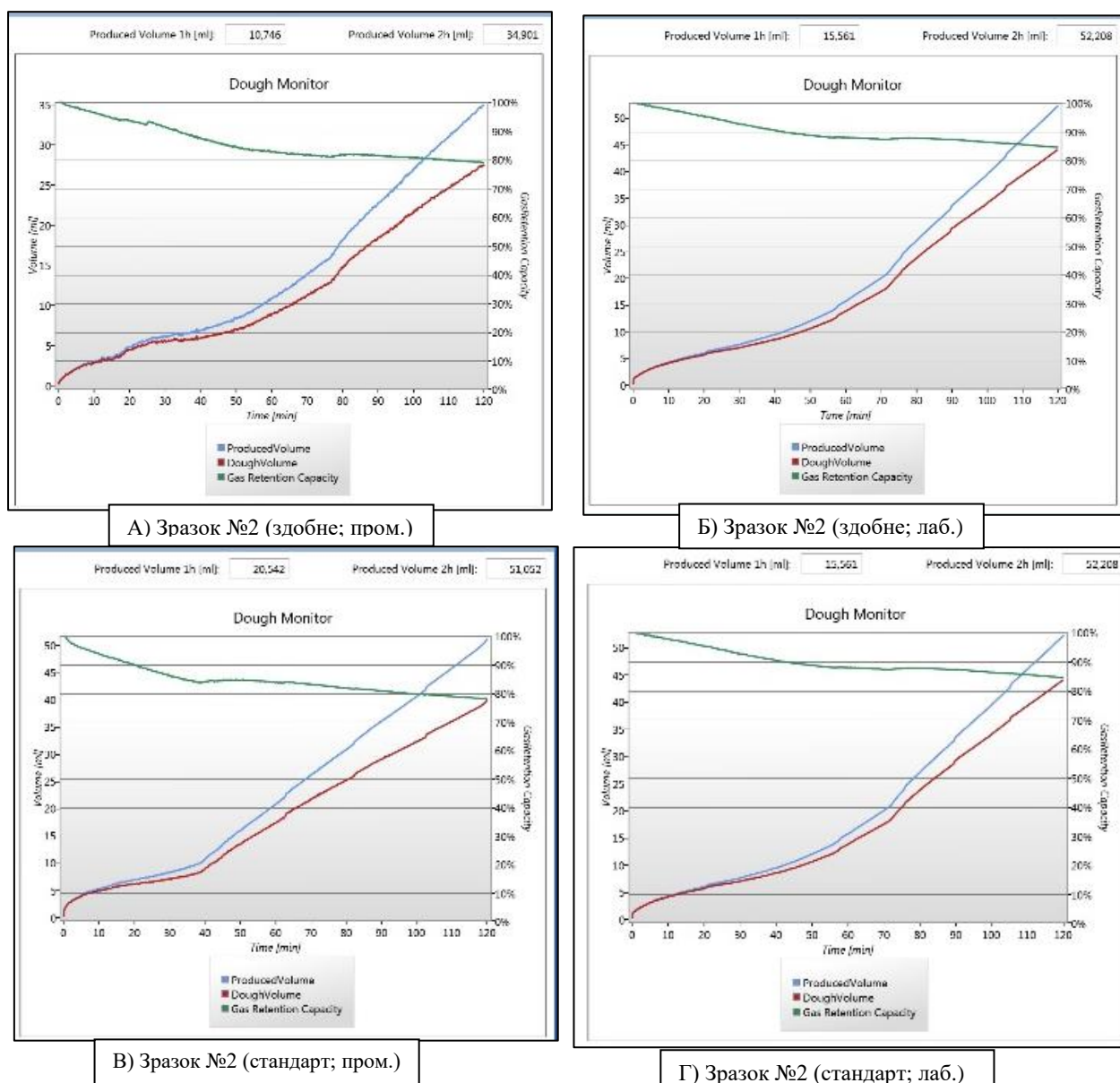


Рис. 3.4. Графіки виходу CO_2 у зразку №1 у штавів, одержаних лабораторним та промисловим шляхом

Виходячи з цього можна припустити, що лабораторно отримані дріжджі зразка №1 показують кращі результати за підйомною силою тіста, що може бути пов'язано з тим, що дріжджі не проходили ніяких обробок, були свіжими та зберегли максимальну активність.

У зразку №2 (рис. 3.5) спостерігаємо, що у здобному тісті промислові дріжджі показали вихід CO_2 29,941, а лабораторні – 52,208; у стандартному тісті: промислові – 34,901, а лабораторні – 43,542



А) Зразок №2 (здобне; пром.)

Б) Зразок №2 (здобне; лаб.)

В) Зразок №2 (стандарт; пром.)

Г) Зразок №2 (стандарт; лаб.)

Рис. 3.5. Графіки виходу CO_2 у зразку №2 у штавів, одержаних лабораторним та промисловим шляхом

У зразку №2 також прослідковується залежність кращого газоутворення у тіста, отриманого на основі лабораторних дріжджів. Графік газоутворення у всіх зразків рівномірно збільшувався, що свідчить про стабільність дослідних зразків та достатню кількість активних дріжджів.

У зразку №3 (рис. 3.6) спостерігаємо, що у здобному тісті промислові дріжджі показали вихід CO_2 16,009, а лабораторні – 11,967; у стандартному тісті: промислові – 57,644, а лабораторні – 51,052.

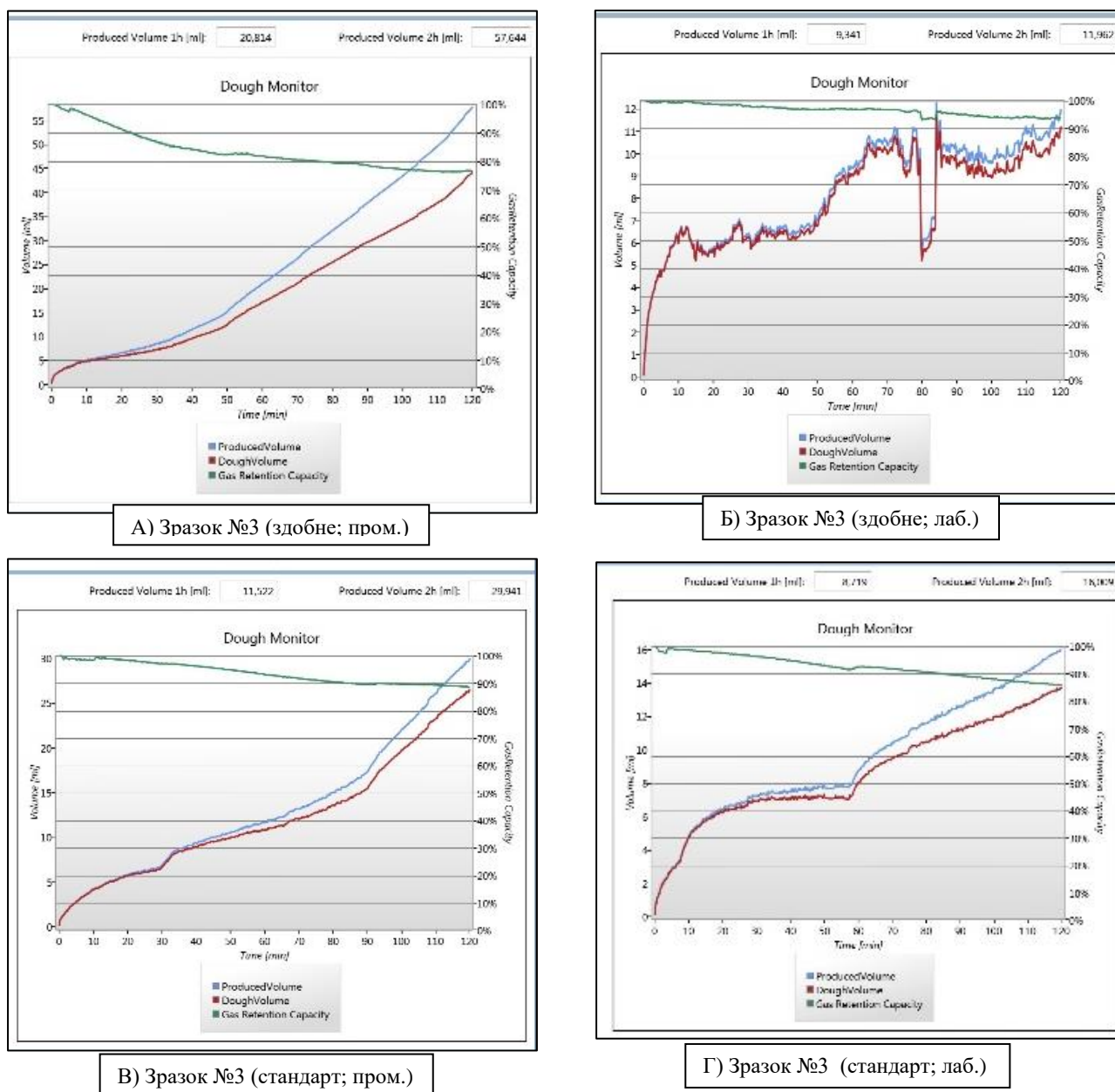
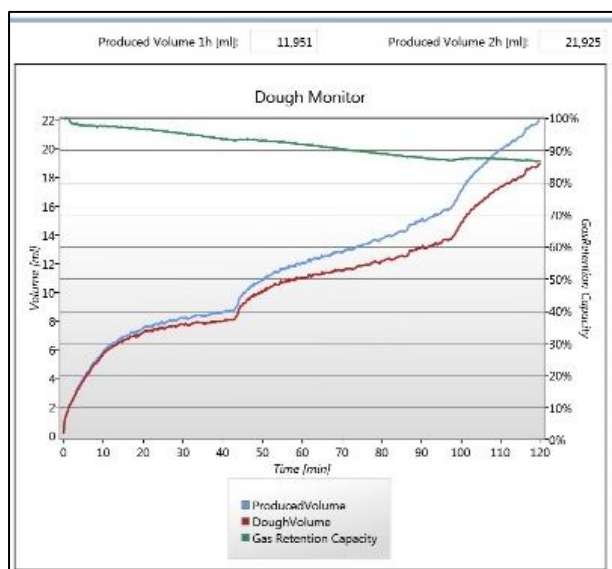


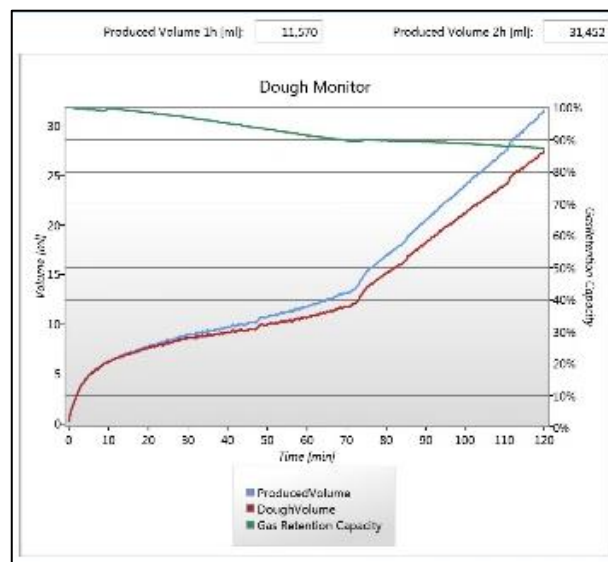
Рис. 3.6. Графіки виходу CO_2 у зразку №3 у штамів, одержаних лабораторним та промисловим шляхом

У здобному тісті результати газоутворення суттєво нижчі, ніж у зразках тіста, приготованих за стандартною рецептурою. Це може бути пов'язано з тим, що ці конкретні умови не підходять саме для цього штаму дріжджів, через що показники такі низькі. До того ж можна прослідкувати, що графіки газоутворення для здобного тіста є нестабільними та з сильними стрибками, що може підтверджувати попереднє припущення. На стандартному тісті результати газоутворення значно кращі та перебувають у нормі.

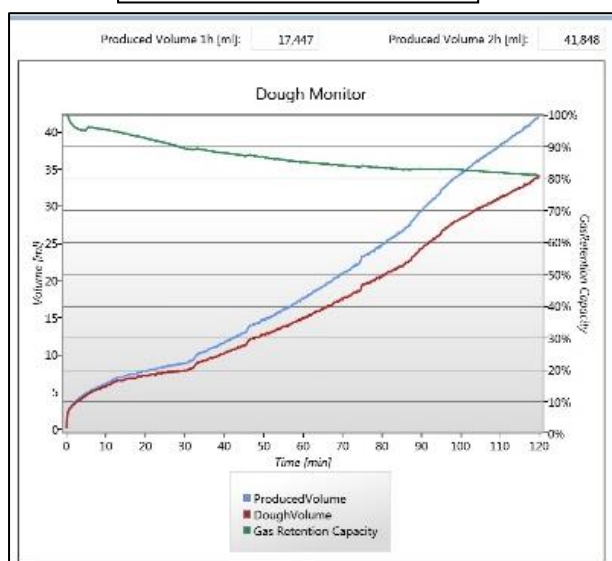
Результати досліджень зразка №1 (рис.3.7) показують, що вихід CO_2 у здобному тісті при лабораторному вирощенні дріжджів дорівнює 31,452, а у промислово отриманих – 21,925. У стандартному тісті даний показник становить у лабораторних дріжджів 41,991, у промислових – 41,848.



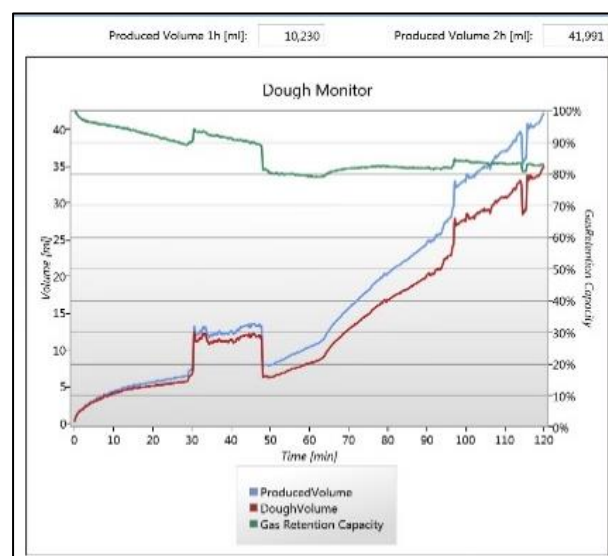
А) Зразок №4 (здобне; пром.)



Б) Зразок №4 (здобне; лаб.)



В) Зразок №4 (стандарт; пром.)



Г) Зразок №4 (стандарт; лаб.)

Рис. 3.7. Графіки виходу CO_2 у зразку №4 у штамів, одержаних лабораторним та промисловим шляхом

У зразку №4 графіки газоутворення, як і вихід газоутворення у тіста, отриманого на основі лабораторних та промислово одержаних дріжджів, не мають суттєвої різниці при рецептурі здобного тіста. У випадку ж стандартної

рецептури тіста бачимо нестабільність у графіку газоутворення, яка в результаті дала вищі значення виходу CO₂.

ВИСНОВКИ

На основані отриманих даних були сформовані наступні висновки:

1. Порівнявши ОД між зразками дріжджів, вирощених на 7,5% та 4% середовищі можна дійти до висновку, що на середовищі з більшим вмістом цукру всі зразки показали кращі результати та дали більший приріст біомаси;
2. Найкраще у колбах на 7,5% середовищі виріс зразок №4 «Vitana» , найгірше – зразок №1 «Львівські дріжджі»;
3. При дослідженні виходу спирту, цукру та формольного числа в середовищі після культивування у маленькому біореакторі найкращі показники були у зразку №2 «Dr.Oetker»;
4. При порівнянні графіків залежності рівня рН і розчиненого кисню можна зробити висновок що найінтенсивніший ріст дріжджів у всіх зразках відбувався з першої до десятої години, а зниження рівня розчиненого кисню супроводжується підвищенням рівня рН;
5. В результаті безротної ферментації на 7,5% середовищі найбільший вихід ферментації мав зразок №2 «Dr.Oetker» – 16,2 %, найменший приріст мав зразок №3 «Саф-Момент» – 11,8%;
6. Проаналізувавши всі графіки підйомної сили, слід відмітити, що: лабораторно одержанні дріжджі показали кращі результати і проявили більшу активність; це може бути пов'язано з тим, що лабораторні дріжджі були свіжішими та мали більше живих клітин, в порівнянні з сухими дріжджами, одержаними промисловим шляхом.
7. Найкращий показник газоутворення за всіма параметрами та на всіх видах тіста і за різних шляхів одержання дріжджів спостерігається у зразку №2 – «Dr.Oetker».

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Грегірчак Н. М. Мікробіологія харчових виробництв: лабораторний практикум. Київ: НУХТ, 2009. 302 с.
2. Душейко В. А. Фізико-хімічні методи дослідження сировини і матеріалів: навчальний посібник. Київ: КНТЕУ, 2003. 202 с.
3. Ковбаса І. М., Чебан Л. М., Воробець М. М. Хімічний та мікробіологічний аналіз харчової продукції: навчальний посібник. Чернівці: ЧНУ, 2014. 196 с.
4. Соколова Н. О. Удосконалення процесу активації дріжджів шляхом використання фітодобавок // Харчова наука і технологія. 2015. 2(31). С. 25-34.
5. Технологія хлібопекарського виробництва. Практикум / Т. Є. Лебеденко, Г. Ф. Пшенишнюк, Н. Ю. Соколова. Одеса: «Освіта України», 2014. 398 с.
6. Янева О. Д., Вороніна Г. О., Підгорський В. С. Ізоляція та характеристика лактозоферментуючих дріжджів *Candida Kefyr*. Інститут Мікробіології І Вірусології НАН України. Київ, 2013. Т. 47, № 6. С. 43-50.
7. Abelson J. N., Simon M. I., Guthrie C., Fink G. R. Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology: Elsevier Science. 2019. 933 p.
8. Almeida M. J., Pais C. Leavening ability and freeze tolerance of yeasts isolated from traditional corn and rye bread doughs. Applied and Environmental Microbiology. 2018. Vol. 62(12). P. 4401–4404.
9. Alves-Araujo C., Almeida M. J., Sousa M. J., Leao C. Freeze tolerance of the yeast *Torulasporea delbrueckii*: cellular and biochemical basis. Fems Microbiology Letters. 2019. Vol. 240(1). P. 7–14.
10. Anja N. Birch, Mikael A. Petersen, Nils Arneborg, Åse S. Hansen. Influence of commercial baker's yeasts on bread aroma profiles. Food Research International. 2019. Vol. 52(1). P. 160-166.
11. Baptista S. L., Costa C. E., Soares P. O. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of top value chemicals from

- biorefinery carbohydrates. *Biotechnology Advances*. 2021. Vol. 47, №2. P. 313-322.
12. Birch A. N., Petersen M. A., Arneborg N., Hansen Å. S.. Influence of commercial baker's yeasts on bread aroma profiles. *Food Research International*. 2020. Vol. 52(1). P.160–166.
13. Birch A. N., Petersen M. A., Hansen Å. S. The aroma profile of wheat bread crumb influenced by yeast concentration and fermentation temperature. *LWT-Food Science and Technology*. 2021. Vol. 50(2). P. 480–488.
14. Birch A. N, van den Berg F. W. J., Hansen Å. S. Expansion profiles of wheat doughs fermented by seven commercial baker's yeasts. *Journal of Cereal Science*. 2019. Vol. 58(2). P. 318–323.
15. Favaro L., Jansen T., van Zyl W. H. Exploring industrial and natural *Saccharomyces cerevisiae* strains for the bio-based economy from biomass: the case of bioethanol. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2019. Vol. 39, №6. P. 800–816.
16. Gallone B., Steensels J., Prah T., Soriaga L., Saels V., Herrera-Malaver B. Domestication and divergence of *Saccharomyces cerevisiae* beer yeasts. *Cell*. 2016. Vol. 166(6). P. 1397-1410.
17. Hernandez-Lopez M. J., Prieto J. A., Randez-Gil F. Osmotolerance and leavening ability in sweet and frozen sweet dough. Comparative analysis between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast strains. *Anton Leeuw Int J G*. 2019. Vol. 84(2). P. 125–134.
18. Investigations in Molecular Cell Biology O'Connor. Yeast growth media. 2024.
URL:
[https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Cell_and_Molecular_Biology/Book%3A_Investigations_in_Molecular_Cell_Biology_\(O'Connor\)/04%3A_Working_with_Yeast/4.02%3A_Yeast_growth_media](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Cell_and_Molecular_Biology/Book%3A_Investigations_in_Molecular_Cell_Biology_(O'Connor)/04%3A_Working_with_Yeast/4.02%3A_Yeast_growth_media)
19. Legras J.-L., Merdinoglu D., Cornuet J.-M., Karst F. Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Molecular Ecology*. 2017. Vol. 16(10). P. 2091–2102.

20. Lip K. Y. F., García-Ríos E., Costa E. C. Selection and subsequent physiological characterization of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains during continuous growth at sub-and-supra optimal temperatures. *Biotechnology Reports*. 2020. Vol. 26, №3. P. 105-114.
21. Parapouli M., Vasileiadis A., Afendra A.-S., Hatziloukas E. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiology*. 2020. Vol. 6, №1. P. 1–31.
22. Piskur J., Rozpedowska E., Polakova S., Merico A., Compagno C. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends in Genetics*. 2016. Vol. 22(4). P. 183–186.
23. Plessas S., Fisher A., Koureta K., Psarianos C., Nigam P., Koutinas A.A. Application of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *L. helveticus* for sourdough bread making. *Food Chemistry*. 2018. Vol. 106(3). P. 985–990.
24. Randez-Gil F., Corcoles-Saez I., Prieto J.-A. Genetic and Phenotypic Characteristics of Baker's Yeast: Relevance to Baking. *Annu Rev Food Sci. Technol*. 2021. Vol. 4. P. 191–214.
25. Rezaei M. N., Dornez E., Jacobs P., Parsi A., Verstrepen K. J., Courtin C. M. Harvesting yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) at different physiological phases significantly affects its functionality in bread dough fermentation. *Food Microbiology*. 2017. Vol. 39. P. 108–115.
26. Saerens S. M., Delvaux F. R., Verstrepen K. J., Thevelein J. M. Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial biotechnology*. 2020. Vol. 3(2). P. 165–177.
27. Sicard D., Legras J.-L. Bread, beer and wine: yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Comptes rendus biologies*. 2019. Vol. 334(3). P. 229–236.
28. Spor A., Nidelet T., Simon J., Bourgais A., Sicard D. Niche-driven evolution of metabolic and life-history strategies in natural and domesticated populations

- of *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Evolutionary Biology*. 2019. Vol. 9. P. 296–312.
29. Steensels J., Snoek T., Meersman E., Nicolino M. P., Voordeckers K., Verstrepen K. J. Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiology Reviews*. 2018. Vol. 38(5). P. 947–955.
30. Steensels J., Verstrepen K. J. Taming wild yeast: potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. *Annual Review of Microbiology*. 2014. Vol. 68, №. 1. P. 61–80.
31. Steensels J., Verstrepen K. J. Taming wild yeast: potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. *Annual review of microbiology*. 2017. Vol. 68(61). P. 80.
32. What is OD (Optical Density) and how it is used. 2023. URL: <https://polaridad.es/uk/que-es-la-od-densidad-optica-y-como-se-utiliza-en-la-electronica/>
33. Yang D. S., Lee K. S., Jeong O. Y., Kim K. J., Kays S. J. Characterization of volatile aroma compounds in cooked black rice. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2018. Vol. 56(1). P. 235–240.
34. YeastForce. Affordable and accurate yeast performance testing for baking and yeast industry. 2024. URL: <https://www.bluesens.com/products/gas-analyzers/yeastforce>
35. Yiani M., Capece A., Comitini F., Canonico L., Siesto G., Romano P. Yeast interactions in inoculated wine fermentation. *Frontiers in Microbiology*. 2016. Vol. 7(555). P. 1-7. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00555