

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
БІЛОЦЕРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
БІОЛОГО-ТЕХНОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Спеціальність 162 – «Біотехнології та біоінженерія»

Допускається до захисту
Зав. кафедри харчових
технологій і технологій
переробки продукції
тваринництва,
доцент Загоруй Л.П.

«___» _____ 20__ року

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА БАКАЛАВРА

**АНАЛІЗ БІОТЕХНОЛОГІЇ ВИРОБНИЦТВА
ВІТАМІНУ А**

Виконав: Степанюк Дмитро Ігорович

Керівник: Цехмістренко О.С.

Рецензент: _____

Я, Степанюк Д.І., засвічую, що кваліфікаційну роботу виконано з дотриманням принципів академічної доброчесності.

Біла Церква – 2025

ЗМІСТ

Завдання на кваліфікаційну роботу здобувачу	3
Анотація	4
Annotation	5
Відгук керівника роботи	6
Рецензія	7
ВСТУП	8
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	10
1.1 Основні промислові продуценти	10
1.2. Біологічні особливості продуцента	11
1.3. Характеристика кінцевого продукту	16
1.4. Схема хімічних перетворень	18
1.5.Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології	20
1.6. Методи очистки та виділення цільового продукту	20
1.7. Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси	24
2. МАТЕРІАЛ І МЕТОДИКА ВИКОНАННЯ РОБОТИ	28
3. ВЛАСНІ ДОСЛІДЖЕННЯ	37
3.1. Характеристика цільового продукту	37
3.2. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, застосованих у виробництві	38
3.3. Опис технологічного процесу	39
3.4. Обґрунтування вибраної конструкції ферментеру	51
3.5. Вибір загальнозаводського обладнання	54
4. ЕКОНОМІЧНА ЕФЕКТИВНІСТЬ	55
ВИСНОВКИ ТА ПРОПОЗИЦІЇ	58
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	59

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
БІЛОЦЕРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
БІОЛОГО-ТЕХНОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Затверджую

Гарант ОП 162 «Біотехнології та біоінженерія»,
професор Мерзлов С.В.

_____ 20__ р.

ЗАВДАННЯ

на кваліфікаційну роботу здобувачу

Степанюку Дмитру Ігоровичу

Тема: **АНАЛІЗ БІОТЕХНОЛОГІЇ ВИРОБНИЦТВА ВІТАМІНУ А**

Затверджено наказом ректора № від _____

Термін здачі здобувачем готової кваліфікаційної роботи в деканат:

до «__» _____ 20__ р.

Перелік питань, що розробляються в роботі. Вихідні дані

Календарний план виконання роботи

Етап виконання	Дата виконання етапу	Відмітка про виконання
Вступ		
Огляд літератури		
Матеріал і методика виконання роботи		
Власні дослідження		
Економічна ефективність		
Оформлення роботи		
Перевірка на плагіат		
Подання на рецензування		
Попередній розгляд на кафедрі		

Керівник кваліфікаційної роботи _____ д-р с.-г. наук Цехмістренко О.С.

Здобувач _____

Степанюк Д.І.

Дата отримання завдання «__» _____ 20__ р.

АНОТАЦІЯ

**Степанюк Д.І. АНАЛІЗ БІОТЕХНОЛОГІЇ ВИРОБНИЦТВА
ВІТАМІНУ А**

Дипломна робота бакалавра за спеціальністю 162 Біотехнологія та інженерія. – Білоцерківський національний аграрний університет, Біла Церква, 2025 рік.

Робота присвячена вдосконаленню процесів біосинтезу, очищення готової продукції за виробництва вітаміну А (β-каротину). Як продуцент β-каротину використано дві статеві форми штаму гетероталічного зигоміцетного грибу *Blakeslea trispora* K2, отриманого як результат селекції із застосуванням хімічного мутагенезу. Здійснено аналіз літературних даних щодо характеристики та класифікації каротиноїдів, різноманіття мікроорганізмів-продуцентів каротиноїдів, зокрема бета-каротину. Обрано ефективне та перспективне обладнання для біосинтезу. Наведено характеристики ферментеру.

Апробація. Результати бакалаврської роботи оприлюднено на Всеукраїнській науково-практичній конференції здобувачів вищої освіти «МОЛОДЬ – АГРАРНІЙ НАУЦІ І ВИРОБНИЦТВУ. Новітні технології виробництва та переробки. Продукції тваринництва, харчові технології» (БНАУ, Біла Церква, 25 квітня 2025 року).

Публікації. За темою дипломної роботи опубліковано тези доповіді конференції.

Степанюк Д.І. Аналіз біотехнології виробництва вітаміну А. МОЛОДЬ – АГРАРНІЙ НАУЦІ І ВИРОБНИЦТВУ. Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції здобувачів вищої освіти. Біла Церква: БНАУ, 2025. Сс. 63-65.

Кваліфікаційна робота бакалавра містить 61 сторінку, 4 таблиці, 8 рисунків, список використаних джерел із 45 найменувань, 0 додатків.

Ключові слова: гетероталічний гриб, *Blakeslea trispora*, вітамін А, β-каротин, поживне середовище, біосинтез, екстрагування, кристалізація.

ANNOTATION

Stepaniuk D.I. ANALYSIS OF VITAMIN A PRODUCTION BIOTECHNOLOGY

Bachelor's thesis in specialty 162 Biotechnology and Engineering. – Bila Tserkva National Agrarian University, Bila Tserkva, 2025.

The work is devoted to the improvement of biosynthesis processes, purification of finished products for the production of vitamin A (β -carotene). As a producer of β -carotene, two sexual forms of the heterothallic zygomycete fungus *Blakeslea trispora* K2 strain, obtained as a result of selection using chemical mutagenesis, were used. An analysis of literature data on the characterization and classification of carotenoids, the diversity of microorganisms producing carotenoids, in particular beta-carotene, was carried out. An effective and promising equipment for biosynthesis was selected. The characteristics of the fermenter are given.

Approbation. The results of the bachelor's thesis were published at the All-Ukrainian Scientific and Practical Conference of Higher Education Applicants “YOUNGS FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND PRODUCTION” (BTsNAU, Bila Tserkva, April 25, 2025).

Publications. The thesis of the conference report was published on the topic of the thesis.

Stepanyuk D.I. Analysis of the biotechnology of vitamin A production. YOUNGS FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND PRODUCTION. Materials of the All-Ukrainian Scientific and Practical Conference of Higher Education Applicants. Bila Tserkva: BNAU, 2025. Pp. 63-65.

The master's qualification work contains 61 pages, 4 tables, 8 drawings, list of used sources from 45 names, 0 annexes.

Key words: heterothallic fungus, *Blakeslea trispora*, vitamin A, β -carotene, nutrient medium, biosynthesis, extraction, crystallization.

ВІДГУК КЕРІВНИКА

на кваліфікаційну роботу здобувача ___ курсу спеціальності

прізвище, ім'я, по батькові

на тему _____

Оцінка окремих складових кваліфікаційної роботи:

1. **Оформлення роботи** (не більше 10 балів) _____
2. **Своєчасність подання окремих елементів роботи керівнику** (кожний своєчасно поданий елемент дає по 5 балів) _____
3. **Теоретичні та аналітичні аспекти роботи** (не більше 25 балів)

4. **Практичні аспекти роботи** (не більше 20 балів) _____

5. **Оцінка попереднього захисту** (не більше 25 балів) _____

Додаткові думки та загальний висновок керівника _____

Загальна оцінка (не більше 100 балів) _____

Керівник кваліфікаційної роботи

підпис

ініціали

вчене звання, прізвище,

_____ 20__ р.

РЕЦЕНЗІЯ

на кваліфікаційну роботу здобувача ___ курсу спеціальності

прізвище, ім'я, по батькові

Тема: _____

Кваліфікаційну роботу виконано на кафедрі _____

під керівництвом _____

Обсяг роботи _____ с. Робота містить ___ таблиць, ___ рисунка.

Список літератури включає _____ першоджерел.

Тема роботи є _____
актуальною, не актуальною, чітко визначеною, не чітко визначеною

Зміст роботи тему розкриває _____

повністю, не повністю, тему не розкриває

Роботу оформлено _____

відповідно до вимог, з порушенням вимог

Висновки і пропозиції _____

Обґрунтовані/необґрунтовані, відповідають/не відповідають поставленим завданням

Найбільш вагомим результатом роботи є _____

вказати ключові аспекти роботи

Зауваження, побажання: _____

Висновок _____

відповідає/ не відповідає вимогам, заслуговує оцінки відмінно, добре, задовільно

Рецензент _____

підпис, вчене звання прізвище, ім'я, по батькові

_____ 20__ р.

ВСТУП

Актуальність теми. Нині єдино економічно обґрунтованим промисловим способом отримання β -каротину є мікробіологічний, що ґрунтується на одночасному культивуванні разом двох статевих форм міцеліального грибу *Blakeslea trispora*. Його живу масу використовують як вихідну сировину для синтезу і застосування низки каротиновмісних продуктів із антиоксидантними та радіопротекторними властивостями, з огляду на це попит на такі продукти щороку зростає у різних галузях господарства багатьох країн. Тому фахівці-біотехнологи, мікологи, генетики тощо значну увагу приділяють інтенсифікації біосинтезу та зростанню обсягу промислового виробництва каротиновмісної біомаси для насичення ринку, перетворенню продукції на конкурентоспроможну, а виробництво – на прибуткове. При цьому акцент здійснюють на підвищення продуктивності штамів грибів та розробку нових препаративних форм кінцевого продукту. Від вирішення питань інтенсифікації процесів промислового одержання каротинвмісної біомаси та продуктів на її основі залежить стратегія подальшого розвитку технологій та галузей, що використовують таку продукцію, ринку споживання, матеріальний, технічний та економічний стан виробництва. Одним із варіантів втілення такої мети є вдосконалення наявних та розробка нових технологічних режимів на базових етапах виробництва, що дозволить інтенсифікувати відповідні процеси, покращити їх техніко-економічні показники та якість кінцевих продуктів.

Активність вітаміну А забезпечують каротиноїди із вмістом у молекулах кільця β -іону (3,4-дегідріону), зв'язаного із аліфатичним ланцюгом із системою спряжених подвійних зв'язків, найбільш біологічно активним є β -каротин. Окрім вивченої функції як провітаміну А, каротиноїди здійснюють захист організму та продукції від впливу вільних радикалів, ліпідних пероксидів, неспецифічних активаторів імунної відповіді.

Основним джерелом одержання каротину є морква, гарбуз, обліпиха, люцерна, конкурентоспроможними стають біотехнологічні методи

виробництва, зокрема такі, що використовують одноклітинні водорості, бактерії та міцеліальні гриби.

Каротиноїди наявні у мукових грибах, окремі види яких характеризуються надсинтезом, вигідним для одержання каротину промислово. Значно зацікавлені мікробіологи-технологи у гетероталічних грибах порядку *Mucorales* (*Phycomyces blakesleanus*, *Blakeslea trispora*) та зеленій одноклітинній мікроскопічній водорості *Dunaliella salina*.

Донині каротин, отриманий за культивування *Blakeslea trispora*, застосовували як харчовий барвник для масла, маргарину, сиру, морозива та, у незначних кількостях, як вітамінний додаток до харчових продуктів. Водночас біомасу із натуральними каротиноїдами у складі використовують як добавку до раціонів годівлі тварин та птиці.

Найбільшими підприємствами вітамінної промисловості є «Біостимулятор» (Одеса), «Вітаміни» (Умань), «Київський вітамінний завод», «Дарниця», «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод», «Київмедпрепарат» (Київ), «Червона Зірка» (Харків), «Галичфарм» (Львів), «Дніпрофарм» (Дніпро), «Лубнифарм» (Лубни, Полтавська область). Українська вітамінна продукція не поступається європейським аналогам та відповідає міжнародним стандартам якості [22].

З огляду на вищесказане, розширення сфер застосування натуральних каротиноїдів та збільшення асортименту наявної продукції із вмістом β -каротину потребує зростання та удосконалення промислового виробництва мікробного каротину з біомаси грибу *Blakeslea trispora*.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Основні промислові продуценти

Як і рослини, мікроорганізми активно синтезують β -каротин. Епіфітна мікрофлора жита містить активний біосинтетик β -каротину *Mycobacterium pheii* (вперше виділено у 1961 р.). Окрім *Mycobacterium pheii* відомо низку мікроорганізмів-активних синтетиків: мікобактерії (*Mycobacterium stegmatis*, *Mycobacterium laticolum*, *Mycobacterium brevicoli*), бактерії видів *Mycrococcus glutamicus*, *Mortirela rommaniana*, *Mycrococcus roseum*, бактерії роду *Pseudomonas*, фітопатогенні мікоплазми родини *Mycoplasmataceae* та *Acholeplasmataceae*, актиноміцети помаранчевої групи, проактиноміцети, корінеформні бактерії та дріжджі (*Actinomyces aureomonopodiales*, *Actinomyces auroverticillatus*, *Actinomyces chryzomallus*, *Streptomyces medilary*, *Corinebacterium poinsetiae*) [26; 32], дріжджі роду *Rhodotorulla*, *Sporobolomyces* (*R. flava*, *R. glutinis*, *R. rubra*, *Sp. roseus*). Водночас каротиноїди знаходять у хлоропластах водоростей *Euglena*, *Ulva*, *Cyanophyta*, *Chlorella*, *Sconodesmus*, *Dunaliella salina* тощо.

Водорість *Dunaliella salina* поширена та застосовується у теплих країнах з тривалим періодом інтенсивної сонячної активності (Австралія, Ізраїль, США) для отримання каротиновмісних біомаси, паст, інших комерційних продуктів. Використання водорості дозволяє отримати вихід β -каротину на рівні 14 % (перерахунок на абсолютно суху біомасу). Водорості вирощують у великих водоймах, поблизу солоних озер в місцях з високою сонячною активністю, а для збагачення водорості каротином різко збільшують концентрацію солі у воді. Біомаса дуналієли містить (в 1 кг) до 30 г каротину, 400 г гліцерину, значну кількість білка. Окремо [13] на основі біомаси *Dunaliella salina* відпрацьовано технології виробництва вітамінних концентратів з різним вмістом каротиноїдів (80 мг/г; 200 та 250 мг/г біомаси).

Перспективною в отриманні каротиноїдів є водорість спіруліна, вміст яких в її біомасі становить 300–600 мг%. Однак зроблено висновок щодо обмеженої участі бактерій, водоростей та грибів у промисловій ферментації з

огляду на низькі швидкість та продуктивність біосинтезу ними β -каротину.

Найпродуктивнішим продуцентом β -каротину є муковий гриб *Blakeslea trispora* (*Choanephora trispora*) класу *Phycomycetes*, добрими продуцентами є й інші гриби роду *Choanephoraceae* (*Ch. cucurbitarum*, *Ch. circinans*, *Ch. heterospora*, *Ch. infudibulifera*), зокрема за сумісного вирощування “плюс” та “мінус” форм в аерованій культурі та на сприятливому поживному середовищі. Значну роль у продукуванні грибами роду каротиноїдів відіграють статеві гормони (триспоріві кислоти) [40].

Бісексуальність нижчих грибів була відкрита у 1904 році англійцем Блекслі, що досліджував умови утворення зигоспор у *Rhizopus nigricans*, саме він ввів термін “гетероталлізм”. У 1956 році вперше було ферментативно отримано натуральні каротиноїди (β -каротин, лікопін, ксантофіл) з використанням мукових грибів родини *Choanephora*. Вперше на мукові гриби, як продуценти каротиноїдів, звернули увагу Барнет (1956 р.) пізніше Циглер (1965 р.), В.Д. Кузнєцов, Г.К. Скрябін (1966 р.), М.Н. Бехтерева (1969 р.), були вказані спеціальні умови вирощування *Blakeslea trispora*, використовуючи глибинне культивування за певних співвідношень міцелію різних статевих форм. Встановлено стимулюючий вплив на біосинтез β -каротину за введення в культуральну рідину чи середовище для ферментації α - та β -іононів, інших терпеноїдів, а застосування антиоксидантів (іонол, сантохін, агідол) попереджує пероксидаційні процеси каротиноїдів за висушування та зберігання біомаси. Надалі вчені модифікували поживні середовища та намагались зменшити взаємозалежність різних статевих форм гриба за біосинтезу каротиноїдів [23].

Використання нижчого гриба *Blakeslea trispora* дозволяє накопичити в процесі ферментації велику кількість біомаси за росту на дешевих субстратах. Для біосинтезу каротиноїдів використовують як спори, так і вегетативний міцелій “плюс” та “мінус” статевих форм [24].

1.2. Біологічні особливості продуцента

Вид *Blakeslea trispora* відносять до роду *Blakeslea*, родини

Choanephoraceae, порядок мукорові, відділ мукороміцети, царство гриби.

Blakeslea trispora – гетероталлічний вид, утворює великі (60-90 мкм в діаметрі) сферичні багатоспорові спорангії, часто з коронкою, від білого на початку до темно-коричневого кольору, та спорангіолі (дрібні яйцеподібні спорангії 10-16•8-12 мкм. Вегетативний міцелій складається з ниткоподібних гіфів діаметром від 2 до 20 мкм; гіфи окремих штамів мають дрібні лопатні вирости або здуття та незабарвлену оболонку. Молоді гіфи містять гомогенний протопласт зі слабкою базофілією, за старіння міцелію в них можуть з'являтися вакуолі та безбарвні або різної інтенсивності золотаво-оранжеві ліпідні включення, за сумісного вирощування “плюс” та “мінус” форм – кристали каротину та його попередники. Безстатеве розмноження – спорангіальне (стілоспорангії та спорангії). На міцелії можуть утворюватися хламідоспори (інтеркалярні, широкоелліптичні до веретеновидних або неправильної форми, 13-28•11-20 мкм) [23; 24].

Статевий процес зигогамний (гаметогамний), відбувається кон'югація двох гаметангіїв одного чи різних таломів, утворюється зигоспора. Утворенню зигот передуює поява яскраво-помаранчевої каротинвмісної смуги в місці контакту різностатевих міцеліїв, що дозволяє встановити корелятивний зв'язок між статевим процесом та каротиноутворенням. Взаємозалежність даних процесів було встановлено після виділення сполук терпенової природи (триспорових кислот), статевих гормонів (прогормонів), здатних прискорювати біосинтез каротиноїдів, особливо “мінус” формою.

Під час біосинтезу каротин накопичується в клітинах *Blakeslea trispora*, а власні жири гриба (до 60% всієї біомаси) сприяють розчиненню каротину за ферментації та підвищують його доступність для засвоєння. Технологія отримання мікробіальних каротиноїдів – екологічно чиста завдяки відсутності шкідливих викидів і застосуванню неагресивних реагентів.

За культивування у культурах зигоспорангії з'являються на поверхні і всередині субстрату, забарвлені, з численними незабарвленими зигоспорами. На початку культури – білі, потім – з жовтими плямами. Повітряний міцелій

несептований. Спорангіофори розташовані на субстратному міцелії.

Триспорові кислоти та вітамін А є природними стимуляторами біосинтезу каротиноїдів у *Blakeslea trispora*, водночас триспорові кислоти за структурою подібні до неприродного стимулятора біосинтезу каротиноїдів β -іону, діючого в багатих на лінолеву кислоту олійних середовищах. Стимуляторами каротиноутворення є аміди, лактами, гідразини, заміщені піридини (сукцинамід втрічі збільшує кількість каротиноїдів за сумісного культивування (+) та (-) штамів), які діють як стрес-фактори, порушують гомеостаз, інтенсифікуючи синтез вторинних метаболітів.

Наразі для біосинтезу β -каротину використовують харчову сировину (кукурудзяна та соєва мука, рослинні олії), відходи крохмалепатокового виробництва (патока кукурудзяна зелена, рідкий кукурудзяний екстракт), мінеральні солі (калій дигідрофосфат) та вітаміни (тіаміну хлорид).

Соєва мука (додається у кількості 2,3 % загального об'єму) є джерелом амінокислот та білків із дисульфідними зв'язками. За вирощування грибної культури у колбах вона споживає менше 60 % амінокислот. Встановлено, що продуцент не показує ауксотрофності за окремими амінокислотам та є здатним до самостійного синтезу практично всіх необхідних амінокислот. Поживне середовище для вирощування маточної культури продуцента збагачують дигідрофосфатом калію та вітаміном В₁ (останній спричиняє зростання біомаси в 1,1–1,5 рази в широкому діапазоні концентрацій, від $1 \cdot 10^3$ до $1 \cdot 10^7$ мкг/дм³, та сприяє синтезу каротиноїдів (за концентрації тіамінхлориду $2 \cdot 10^4$ мкг/дм³ вихід каротиноїдів зростає на 5–10 %).

Bl. Trispora, як продуцент каротиноїдів, є надзвичайно чутливим до впливу температури та інфекцій, тому на всіх технологічних стадіях прагнуть підтримувати постійну $t=28 \pm 1^\circ\text{C}$ та стерильність.

β -каротин накопичується у міцелії за стимуляції синтезу триспориновими кислотами (β -іонон) та контролю позитивних зворотних зв'язків [18]. Мутантний штам *B. trispora*, вирощений з додаванням β -іону, продукує біомасу із вмістом 30 мг β -каротину в 1 г сухої маси за

вирощування в умовах контрольованого надходження кисню та контролю віку фази вегетативного росту за 5-6 днів [2]. Водночас світлова стимуляція синтезу каротиноїдів показує залежність ступеню фотоіндукції каротиногенезу від довжини хвилі та тривалості експозиції [18].

Уніфіковане середовище для ферментації у ферментерах містить дешеві відходи крохмалепатокового виробництва (зелена кукурудзяна патока, кукурудзяний екстракт. Середовище має містити близько 2,0 % рослинної олії, необхідної для каротиноутворення. Поживні середовища за складом підбирають так, аби не лімітувати продуцент за поживними речовинами, зокрема ріст гриба та накопичення біомаси відбуваються інтенсивніше на багатих середовищах із надлишками амінного нітрогену та фосфору (на 20-30 % та 50-60 %) та без обмежень за редукувальними речовинами. Зелена патока містить переважно глюкозу, дицукриди, продукти неповного розпаду крохмалю, меланоїдини. Глюкоза та мальтоза є найкращими для синтезу біомаси, та надлишок першої може негативно впливати на синтез β -каротину, другої – навпаки, не інгібує. Спирти (манніт, сорбіт, інозит, дульцит), рамноза та арабіноза асимілюються грибом помітно гірше, тож субстрати із ними у складі показують незначне накопичення біомаси.

Біосинтез каротиноїдів відбувається за загальною схемою синтезу ліпідів ізопреноїдної (терпенової) групи, тож жирнокислотний склад застосованих для біосинтезу рослинних олій має суттєве значення. Стимулююче на синтез впливають ненасичені жирні кислоти (лінолева, олеїнова, ліноленова, притаманні соєвій, соняшниковій, кукурудзяній оліям).

Максимальне значення екзоліпазної активності грибу спостерігається на 30 та на 80–95 годинах ферментації (другий пік, пов'язаний зі зростанням жирності біомаси за рахунок власного літогенезу. Зазвичай за скорочення тривалості ферментації до 60–70 годин та за відсутності ліпідних підживлень на 35–47 годині ферментації другий пік не спостерігається). Ферментаційне поживне середовище містить 90–125 мг% амінного нітрогену із рідкого кукурудзяного екстракту. За ферментації споживається близько 65–70%

амінного нітрогену середовища, однак каротиноутворення грибом *B. trispora* відбувається ефективніше за вмісту аміноного нітрогену в середовищі понад 70мг%. Встановлена пряма корелятивна залежність ($R=32\%$) між початковою концентрацією аміноного нітрогену в середовищі та каротиногенезом.

Окремі технологічні процеси одержання каротиноїдів передбачають застосування у складі поживного середовища недефіцитних джерел нітрогенового живлення (нітрати, солі амонію, нітрити, карбаміди). Особливо перспективними є солі амонію (хлорид, сульфат) та сечовина.

Джерелом вуглеводів у середовищі біосинтезу каротиноїдів є зелена кукурудзяна патока, гідрол, глюкоза тощо, а кількість редукувальних речовин має становити 0,9–1,2%. Мікроорганізми утилізують редукувальні речовини вже під час трофофази (до 70 %) до 27–30 години ферментації; решта цукрів споживається впродовж ідіофази. Зростання концентрації глюкози в середовищі понад 1,2% спричиняє глюкозну репресію каротиногенезу, а понад 1,7 % –достовірно пригнічує каротиноутворення з одночасним зростанням виходу біомаси (в межах 0,9–2,7 %).

Оптимальним для ферментації є рН поживного середовища 5,9–6,4 (зростання рН понад 6,4 призводить до зниження інтенсивності біосинтезу). За біосинтезу рН змінюється: впродовж перших годин знижується на 0,1–0,3 одиниць, після 15–20 годин культивування знову зростає, досягаючи до 36 годин початкового рівня кислотності, плавно зростаючи до кінця ферментації до 6,7–7,1. Закиснення середовища впродовж перших годин ферментації пояснюється накопиченням органічних кислот (пірвіноградної), подальше зростання рН пов'язане з виділенням лужних речовин як результат автолізу.

Існує вузький діапазон насичення середовища киснем (20-30 %), за якого каротиноутворення культурою *B. trispora* є максимальним, в той час як вище і нижче насичення призводить до повільнішого утворення метаболіту.

Встановлено, що максимальна на діючому обладнанні частота обертання мішалки 185 хв^{-1} сприяє інтенсивнішому споживанню субстратів культурою та додатковому посиленню біосинтезу продуктів (рис. 1а), водночас

відсутній вплив на концентрацію розчинного газу (рис. 1б), наявне лише поліпшення масообміну в системі рідина – біомаса продуценту [14].

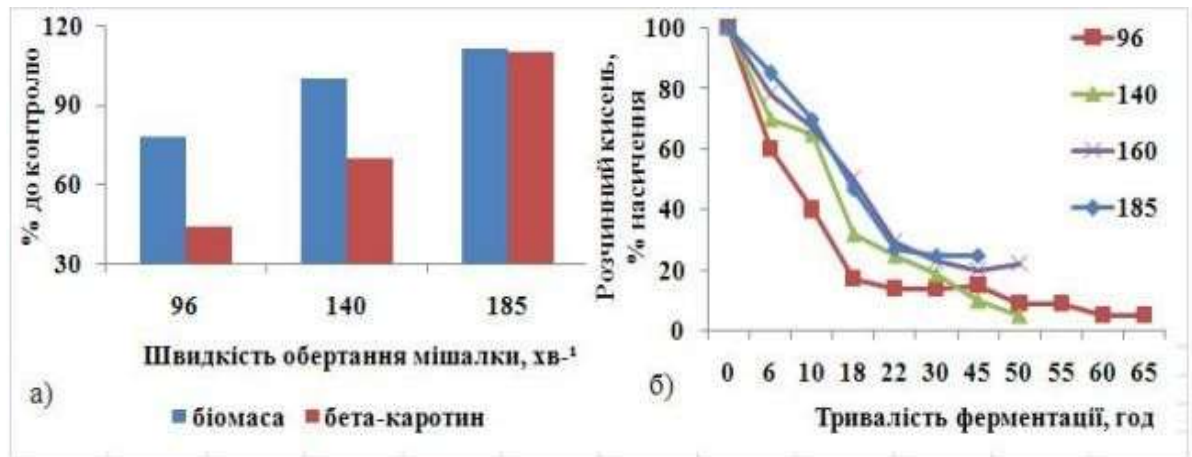


Рис.1. Основні показники біосинтезу за різної швидкості перемішування середовища (хв⁻¹): а) вміст цільових продуктів наприкінці ферментації; б) рО₂ [14]

1.3. Характеристика кінцевого продукту

Вітамін А належить до групи жиророзчинних вітамінів, включає низку близьких структурно сполук: ретинол (А-спирт, вітамін А₁, аксерофтол); дегідроретинол (А₂); ретиналь (ретинен, А-альдегід); ретинолева кислота (вітамін А-кислота); ефіри цих речовин та їх просторові ізомери.

Каротиноїди – вітаміни групи А, їх джерелами є рослини, окремі гриби та водорості, за надходження в організм можуть перетворюватися на вітамін А. До каротиноїдів відносять а, b і d-каротин, лютеїн, лікопен, зеаксантин, відомо близько п'ятиста каротиноїдів – поліненасичені сполуки терпенового ряду, побудовані за єдиним структурним принципом: на кінцях полієнового ланцюга із чотирма ізопреноїдними залишками розташовані циклогексанові кільця чи аліфатичні залишки. Переважно містять 40 атомів карбону, поділяються на каротиноїдні вуглеводні, С₄₀-ксантофіли, гомо-, апо- та нор-каротиноїди. З рослин каротиноїди можуть виділятися екстракцією розчинниками без пероксидів, під розсіяним світлом в інертній атмосфері з подальшим омиленням та хроматографічним розділенням.

α-каротин – червоні кристали, міститься у тих же рослинах, що і β-каротин, та у меншій кількості (до 25 % від вмісту β-каротину). За нагрівання з етилатом натрію частково перетворюється у β-каротин; оптично активний ([α]_D +315°) [10; 12].

Лікопін – кристали червоно-фіолетового кольору, червоний пігмент томатів, з яких його виділяють за допомогою мікробіологічного синтезу, як β -каротин. C_{40} -ксантофіли містять у ізопреноїдному ланцюзі кілька гідроксильних, алкоксильних, епоксидних, альдегідних або кетогруп. У природі поширені лютеїн), віолоксантин, фукоксантин, кріптоксанти, кантоксантин, астаксантин тощо [12; 10]. Усі вони добре розчиняються у хлороформі ($CHCl_3$), сірковуглеці (CS_2), бензені (C_6H_6), гірше в діетиловому ефірі, гексані, жирах та оліях, легко приєднують кисень повітря, нестійкі на світлі та за нагрівання у присутності лугів. З розчином хлориду сурми ($SbCl_3$) у хлороформі ($CHCl_3$) дають характерне синє забарвлення ($\lambda_{\text{макс}}=590$ нм).

Каротиноїди, отримані біотехнологічно з *Blakeslea trispora*, представлені на 90 % β -каротином та на 10 % α -, γ -каротинами та лікопіном.[29]

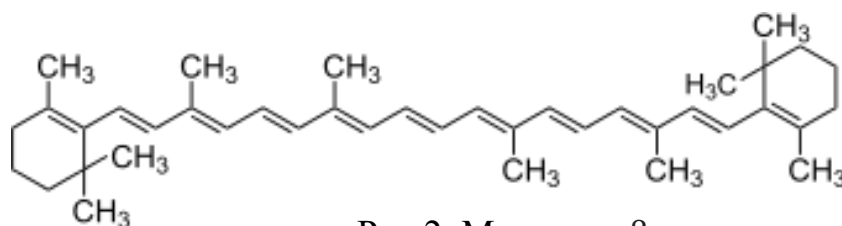


Рис.2. Молекула β -каротину

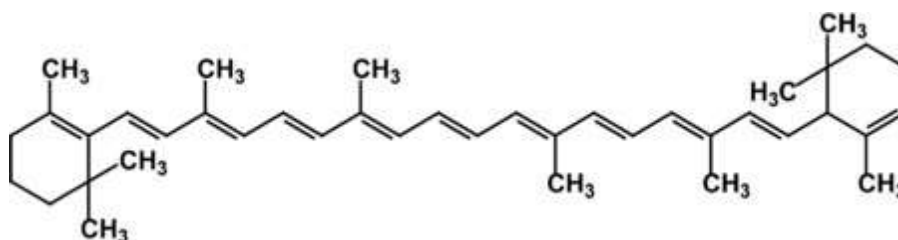


Рис.3. Молекула α -каротину

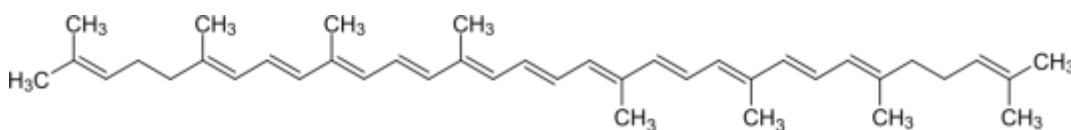


Рис.4. Молекула лікопіну

β -каротин – темно-рубінові кристали, поширений як стабільний транс-ізомер за всіма подвійними зв'язками. У розчинах за дії світла, за нагрівання чи додавання йоду частково ізомеризує у цис-ізомери [10; 29]. Найвідоміший каротиноїд, є попередником вітаміну А (в печінці зазнає окисного розщеплення та β -каротин перетворюється на вітамін А $C_{40}H_{56}$, жиророзчинний помаранчево-жовтий пігмент). Активність вітаміну А

притаманна каротиноїдам із кільцем β -іонуна (3,4-дегідроіонуна) у складі молекул, зв'язаним із аліфатичним ланцюгом із системою спряжених подвійних зв'язків. Найбільша біологічна активність притаманна β -каротину (має два β -іонових кільця, особливо транс-ізомер (рис.2-4).

1.4. Схема хімічних перетворень

1. Утворення первинного C5-попередника. Початковою сполукою в біосинтезі каротиноїдів є ацетат. Дві молекули ацетил-КоА конденсуються з утворенням ацетоацетил-КоА, який конденсується ще з однією молекулою ацетил-КоА, утворюючи 3-гідрокси-3-метилглутарил-КоА. За відновлення цієї сполуки утворюється мевалонова кислота (МВК), яка у присутності АТФ фосфорилується з утворенням пірофосфату МВК. У присутності АТФ шляхом декарбоксілювання і дегідрування пірофосфат МВК перетворюється у карбонову ізопренову одиницю – ізопентенілпірофосфат (рис.5).

2. Біосинтез безбарвних C₄₀-полієнів з C₅-попередника. Ізопентенілпірофосфат (ІПФ) ізомеризується до диметилалілпірофосфату (ДМАПФ), після чого відбувається конденсація ІПФ і ДМАПФ з утворенням геранілпірофосфату ГПФ-синтазою. Ці сполуки із 10 атомами карбону, конденсуються з ІПФ, утворюючи фарнезилпірофосфат ФПФ-синтазою, з якого шляхом подальшої конденсації виникає 20-карбонова одиниця – геранілгеранілпірофосфат ГГПФ-синтазою. Останній димеризується фітоїн-синтазою, утворюючи фітоїн, перший C₄₀-попередник каротиноїдів.

Центральний хромофор фітону із трьох спряжених подвійних зв'язків передбачає існування кількох стереохімічних ізомерів. У природі фітоїн представлений двома ізомерами: 15-цис- і 15-транс-фітоїн. Зазвичай перший – переважаючий, другий – зустрічається у вигляді слідів. В окремих мікроорганізмах весь фітоїн може бути представлений 15-транс-ізомером. Характер ізомеру фітону визначає конфігурацію наступних попередників біосинтезу каротиноїдів, зокрема фітофлуїну.

3. Кінцеві стадії синтезу каротиноїдів (дегідрування, циклізація, введення кисневмісних груп і C5-одиниць).

Встановлено, що α - і β -іононові кільця каротиноїдів утворюються із спільного попередника (рис.6), механізм циклізації якого відрізняється для кожного з них. Нейроспорин (L-каротин) перетворюється на α - і β -зеакаротини на α - і β -каротини відповідно. Введення оксигеновмісних груп в молекулу каротиноїдів відбувається по завершенню циклізації, тобто синтез ксантофілів здійснюється після утворення каротинів.

1.5. Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології

Каротиноїди промислового біотехнологічного препарату з *Blakeslea trispora* містять 90 % β -каротину і 10 % складають α -, γ -каротини та лікопін. Чистота препарату має становити не менше 90% і досягається екстракцією та очищенням культурального середовища. Домішки (до 10% готового продукту) містять інші каротиноїди та низькомолекулярні органічні сполуки.

У виробництві валідують придатність кожного етапу екстракції й очищення щодо видалення та інактивації забрудників з клітин хазяїна та живильного середовища (вірусні частки, білки, нуклеїнові кислоти, допоміжні речовини). Валідація здійснюється для підтвердження відповідності виробництва критеріям: з продукту видалені сторонні агенти, для кожної стадії очищення визначають здатність до зменшення забруднень; з продукту видалені вектор клітини хазяїна, живильне середовище і залишки реактивів; вихід продукту з культури підтримується у встановлених межах; кожна партія продукту є відповідною за ідентичністю, чистотою, підлягає кількісному визначенню, хімічним, фізичним та біологічним випробуванням.

1.6. Методи очистки та виділення цільового продукту

Стадії виділення цільового продукту вітаміну (каротину) різняться залежно від накопичення його в клітині, в культуральній рідині чи сама клітинна маса є продуктом. Найскладніше виділяти внутрішньоклітинні продукти, для чого клітини відокремлюють від культуральної рідини, руйнують (дезінтегрують) та очищають цільовий продукт від масиву компонентів зруйнованих клітин. Виділення продукту є значно легшим за

екскреції його продуцентом у культуральну рідину.

Першим етапом очищення вітаміну є сепарація – розділення культуральної рідини і біомаси, якій іноді передує обробка культури (зміна рН, нагрівання, додавання коагулянтів білка). Існують різні методи сепарації: флотація, фільтрація, центрифугування. Центрифугування і фільтрація в окремих процесах здійснюються комбіновано. Перспективними для осадження вітамінної біомаси є центрифуги-сепаратори, в них біомаса осідає на стінки обертового циліндра.

На другому етапі очищення цільового продукту здійснюють руйнування клітин (дезінтеграція) фізичними, хімічними, хіміко-ферментативними методами. Найбільше промислове значення має фізична дезінтеграція ультразвуком, обертовими лопатями і вібраторами (метод використовується в пілотних і промислових установках), струшування зі скляними кульками; продавлювання через вузький отвір під тиском; розчавлювання замороженої клітинної маси; розтирання у ступці; осмотичний шок; заморожування-відтаювання; стиснення клітинної суспензії з подальшою декомпресією. Фізичні способи дезінтеграції є економічнішими.

Обережне вибіркоче руйнування клітинної стінки можливе за використання хімічних та хіміко-ферментативних методів (лізису клітин антибіотиками, ПАР, гліцином; автолізу клітин за ліміту за окремими субстратами зростання та лізису за зараження бактеріофагами).

Виділення цільового продукту із культуральної рідини чи гомогенату зруйнованих клітин здійснюється шляхом осадження, екстракції або адсорбції.

Осадження розчинених речовин здійснюють фізично (нагрівання, охолодження, розведення або концентрування розчину) та хімічно, переводячи продукт в малорозчинний стан.

Екстракцію поділяють на твердо-рідкофазну та рідко-рідкофазну. До першої відносять просте обливання твердого зразка водою задля вилучення розчинних речовин (солей металів з руд, підданих бактеріальної обробці,

розчинних продуктів із субстрату за твердофазного культивування). Другу застосовують для вилучення з культуральної рідини антибіотиків, вітамінів, каротиноїдів, ліпідів, деяких гідрофобних білків.

Уповні уникнути згубного для низки речовин нагрівання дозволяють методи холодової екстракції (кріоекстракція) з використанням розчинників, що мають низькі температури кипіння і за кімнатної температури перебувають у газоподібному стані.

Екстракцію неполярних органічних сполук здійснюють рідким пропаном чи бутаном. Подальше обережне нагрівання до 0°C сприяє випаровуванню киплячого розчинника та концентрації продукту у чистому вигляді. Кріоекстракцію часом застосовують комбіновано із кріоконсервацією [7; 15]

Процедури вилучення.

По завершенню бродіння колби виймають, ферментаційний відвар обробляють для екстракції β-каротину. Рідину центрифугують до втрати супернатантом кольору, осаджену біомасу сушать при 50°C у вакуумі до постійної ваги. Біомасу подрібнюють пестиком, частинки використовують для екстракції β-каротину наступними процедурами:

Спосіб А: Екстракція при постійній температурі та різних часах вилучення. Біомасу обробляють розчинниками (етанол, метанол, ацетон, петролейний ефір, гексан, суміш гексану:метанолу (1:1) у співвідношенні 100 мл розчинника/г сухої маси біомаси). Екстракцію проводять в обертовому шейкерному інкубаторі при 30°C та різному часі вилучення (30, 60, 90, 120 та 150 хв) при 300 об / хв.

Спосіб В: Екстракція при постійному часі та різній температурі вилучення. Каротиноїдний пігмент витягують з клітин за різних температур екстракції (30, 35, 40, 45 та 50°C) впродовж 2 год. Розчинники – аналогічно способу А (із заміною петролейного ефіру на ацетоновий та нафтовий ефір). Біомасу обробляють ацетоном за вищевказаних температур впродовж 2 год, екстракт центрифугують при 5000g 20 хв. Екстракт ацетону декантують у

воронку-сепаратор, змішаний з рівною кількістю нафтового ефіру, суміш акуратно струшують. Додавання 20 мл дистильованої води відділяє дві фази, додають 5 г сульфату натрію до шару нафтового ефіру. Суміш витримують при 4°C впродовж 1 год, спектри поглинання 450 нм на спектрофотометрі.

Спосіб С: Видалення β -каротину з клітин повторними екстракціями.

Каротиноїдний пігмент видаляють з клітин екстракцією з абсолютним етанолом в інкубаторі з обертовим шейкером (300 об/хв впродовж 2 год та t , оптимальній для кожного розчинника). Після 2 год екстракції рідину центрифугують при 5000 г впродовж 20 хв., супернатант видаляють, осад екстрагують свіжим розчинником. Виділення повторюють чотири рази. Найбільше каротиноїдного пігменту із клітин отримують за допомогою пропарювання ферментаційного бульйону при 121°C впродовж 15 хв, β -каротин видаляється безпосередньо з клітин екстракцією етанолу без висушування біомаси. Перевагами обробки є: відсутність окиснення каротиноїдного пігменту під час висихання біомаси; видалення активності ферментів, що викликають окиснення β -каротину; наявна клітинна пермеабілізація під час пропарювання (дозволяє екстрагувати β -каротин з клітин). Попередня обробка ферментаційного відвару суттєво поліпшує вилучення β -каротину з *B. trispora*.

Максимальну кількість видалення β -каротину з клітин отримують екстракцією етанолом. Інші розчинники (ацетон, метанол:гексан (1:1), метанол, петролейний ефір та гексан) містять меншу кількість вилученого з клітин β -каротину (на 45,0, 65,5, 67,0, 71,5 та 72,0 %). Інші важливі змінні екстрагування включають співвідношення біомаси та розчинника та концентрацію розчинника. Використання етанолу у концентраціях 100, 60, і 40% при співвідношенні 1:100, 1:50 та 1:30 у сухій масі до біомаси дає максимальну кількість вилученого з клітини β -каротину за концентрації 100% етанолу та співвідношення біомаси до розчинника 1:100.

Описана процедура дозволяє відновити β -каротин з *B. trispora* нагріванням ферментаційного бульйону та екстракцією каротиноїдного

пігменту етанолом. Метод відрізняється застосуванням пропарювання ферментаційного бульйону та безпосереднім видаленням β -каротину з клітин. Метод є точним, швидким та відтворюваним, а кількість β -каротину, вилученого з *B. trispora* є вищою порівняно з іншими методами [4]

Лабораторно та промислово каротин отримують наступним чином. По завершенню виробничого культивування рідину нагрівають до 120 С на 15 хв. Культуральну рідину екстрагують етанолом та центрифугують для відділення клітин від культуральної рідини при 3000 об/хв впродовж 10 хв на центрифугі Т-23. Промивають екстракт водою, упарюють розчин задля видалення залишків органічних розчинників, кристалізації каротину та охолодження. Промивають етилацетатом для осадження β -каротину, використовують сушку розпилювальну для досягнення чистоти 90-95%.

1.7. Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси

Роль β -каротину в організмі є безцінною, а для людини найбільший інтерес представляє натуральний β -каротин, його більш біологічно-активна транс-форма. Тривалий час акцентували увагу лише на здатність β -каротину в організмі перетворюватись на вітамін А, однак спектр його дії ширший. Вітамін А приймає участь у редокс-процесах, регуляції синтезу білків, сприяє нормальному метаболізму, функції клітинних і субклітинних мембран, відіграє важливу роль у формуванні кісток, зубів, жирових відкладень; необхідний для росту нових клітин та уповільнення процесів старіння.

Центральним у метаболізмі каротину в печінці та кишківнику є ретиналь, що відновлюється до ретинолу за участі НАД-залежної ретинальдегідредуктази, специфічної щодо відновлення коротко- та середньоланцюгових аліфатичних альдегідів. Вважають, що мікросоми клітин 12-палої кишки мають координовану індукцію ретинальредуктази і β -каротин-15,15'-діоксигенази [6]. Ретиналь може всмоктуватися у незмінному вигляді, перетворюючись на ретинол за впливу ферменту в інших органах і тканинах [1]. Кишківник та печінка містять активну ретинілдегідгеназу (каталізує перетворення з ретиналю зі зміщенням у бік ретинолу).

Клітини слизової оболонки тонкого кишківника містять ретинальноксидазу, що окиснює ретиналь в ретиноєву кислоту [16]. Основна маса ретиноєвої кислоти, на відміну від ретинолу і ретиналю, всмоктується через ворітну вену і виводиться з жовчю у вигляді глюкуронідів [42].

Каротиноїди можуть всмоктуватися у кишківнику без біотрансформації, включатися у склад ліпопротеїдів, транспортуватися до жирової тканини, печінки, надниркових залоз, яєчників, інших органів, де виконують самостійні функції [9]. Каротиноїди є специфічними адаптогенами, забезпечують захист та зростання загальної резистентності організму за дії стресорів [9]. встановлено профілактичний та захисний вплив β -каротину щодо захворювань, що супроводжуються окисним стресом (катаракта, хронічні інфекції, запалення, рак, серцево-судинна патологія тощо) [30].

Антиоксидантні властивості каротиноїдів, насамперед β -каротину [38], зумовлюють їх радіопротекторну [43], антимутагенну [27], імуномодельюючу [39], протиінфекційну, антиканцерогенну дії [20]. Антиоксидантна активність β -каротину ґрунтується на його здатності блокувати утворення синглетного кисню $^1\text{O}_2$, поглинати енергію збудженого електрона без жодних хімічних перетворень, повертаючи $^1\text{O}_2$ в основний (триплетний) стан без пошкодження навколишніх біологічних систем [37]. Подібно β -каротину «гасити» синглетний кисень здатні лікопін, астаксантин, α -, ν -каротини, зеаксантин, резерватол, інші каротиноїди [45]. Як компоненти неферментативної антиоксидантної системи, вони захищають клітинні структури від впливу активних форм кисню, «гасячи» синглетний кисень, нейтралізуючи пероксидні радикали, обриваючи ланцюгові реакції вільнорадикального окиснення ненасичених карбонових кислот [34], зокрема киснева руйнація ліпідних компонентів клітинних мембран [31]. Вважають, що антиоксидантні властивості β -каротину перевершують аналогічні у токоферолу, триптофану, глутатіону, вітаміну А, оскільки він уповільнює вільно радикальне руйнування антиоксидантів. Одночасне використання β -каротину, α -токоферолу та вітаміну С збільшує антиоксидантний вплив.

Давно відомо про вплив вітаміну А на зір, здавна варену печінку (найкраще джерело вітаміну А) використовували від нічної сліпоты. Саме вітамін А забезпечує нормальну діяльність зорового аналізатора, впливає на фоторецептори, приймає участь у синтезі зорового пігменту сітківки та сприйнятті оком світла. Вітамін потрібен для роботи імунної системи, підвищує бар'єрну функцію слизових оболонок, фагоцитарну активність лейкоцитів та інших чинників неспецифічних захисних систем, захищає від простуд, грипу, інфекцій травного каналу, дихальних і сечовивідних шляхів. Відомо, що діти в розвиненіших країнах легше переносять інфекційні хвороби (кір, вітряна віспа), а в країнах з низьким рівнем життя такі інфекції – смертельні, що пов'язують із насиченістю організму вітаміном А. Наявність в організмі вітаміну А подовжує життя навіть хворим на СНІД.

Шкіра, слизові покриви складаються з епітеліальних тканин, які потребують ретинолу для підтримки та відновлення, тож сучасні косметичні засоби містять у складі ретиноїди, синтетичні аналоги ретинолу. Вітамін А використовують для лікування захворювань шкіри (акне, прищі, псоріаз), за її пошкоджень (сонячні опіки, рани) прискорює загоєння, стимулює синтез колагену, покращує якість новоутворених тканин.

Тісно пов'язаний зі слизовими оболонками та епітеліальними клітинами, вітамін А позитивно впливає на роботу легень, застосовується у лікуванні захворювань шлунково-кишкового тракту (виразки, коліти). Ретинол важливий для нормального розвитку ембріона, живлення зародку, зниження ризику ускладнень вагітності, зокрема малої ваги новонароджених.

Вітамін приймає участь у синтезі стероїдних гормонів, сперматогенезі, є антагоністом тироксину, гормону щитоподібної залози.

β-каротин та вітамін А – найсильніші антиоксиданти, приймають участь у профілактиці та лікуванні онкозахворювань, профілактують руциливи. β-каротин і вітамін А захищають мембрани нейронів від руйнівного впливу вільних радикалів, нейтралізуючи найнебезпечніші їх види – радикали поліненасичених кислот та радикали кисню. Антиоксидантний вплив

сприяє запобіганню захворювань серця та артерій, протектує хворих на стенокардію, підвищує вміст "корисного" холестерину (ЛПВЩ). Одна молекула β -каротину зв'язує 5–6 вільних радикалів, перешкоджає утворенню холестеринових бляшок, наростанню ліпідних відкладень на стінках судин, підвищує дієздатність імунної системи.

Лютеїн і зеаксентин – важливі каротиноїди у офтальмології: попереджають катаракту, знижують ризик дегенерації жовтої плями (головного органу зору), що у 30% випадків є причиною сліпоти.

Лікопін – ще один представник каротиноїдів, що захищає від атеросклерозу, запобігає окисненню та накопиченню на стінках артерій холестерину низької щільності, є найдієвішим захистом від раку, зокрема раку молочної залози, ендометрію та простати [25].

2. МАТЕРІАЛ І МЕТОДИКА ВИКОНАННЯ РОБОТИ

2.1. Генетична вивченість біологічного об'єкту

Нині наукові розробки направляють на здешевлення мікробіологічно отриманих препаратів каротиноїдів, що досягається застосуванням методів генної інженерії. Такі роботи здійснюють в двох напрямках:

- 1) відповідальні за синтез ферментів біосинтезу певного каротиноїду гени прагнуть клонувати та експресувати в організми, здатні швидко рости на екологічно чистих та дешевих середовищах;
- 2) шляхи біосинтезу прагнуть змінити в батьківському організмі так, щоб перетворити його в надсинтетика каротиноїдів [33].

В обох випадках перешкодою є відсутність точних відомостей про ферменти біосинтезу окремих каротиноїдів.

Новими напрямками біотехнології каротиноїдів є: інтенсифікація біосинтезу β -каротину у *Blakeslea trispora* зеленим світлом ($1,7 \text{ В/м}^2$) впродовж 48 годин (світло сприяє отриманню спорового матеріалу, вирощеного за фотовпливу); хімічне блокування біосинтезу β -каротину з метою одержання попередника β -каротину – лікопіну; одночасне одержання каротиноїдів та біологічно активних сполук убіхінонової природи.

2.2. Загальні методи створення високопродуктивного промислового штаму

Мікроорганізми, як об'єкти селекції, мають свої особливості:

- Культури можна виділяти практично з 1 клітини (висока генотипна однорідність).
- Через швидке розмноження наявна висока мінливість генотипу.
- Мікроорганізми зазвичай є гаплоїдними (відсутні приховані рецесивні ознаки).
- Вегетативне розмноження.
- Швидка зміна поколінь.

Для отримання промислових продуцентів застосовують виділення клітин з природних субстратів, експериментальне підвищення активності

культури, отримання корисних форм методом гібридизації та відбір нових форм після дії мутагенів [32].

2.3. Використання природного та штучного добору

Відбір поділяють на природний (процес виживання найадаптованіших до довкілля організмів та отримання великої кількості їх потомства) та штучний (здійснюється людиною на власний розсуд з метою одержання нових штамів). Метод природного та штучного відбору полягає в отриманні форми мікроорганізму, більш придатної, аніж оригінальна, в даному середовищі. Для цього створюють умови вирощування, за яких нова форма завдяки природним мутаціям витісняє оригінал із популяції. Культивування в змінених умовах, що потребують пристосувань, зміна генотипічної структури популяції спричиняє "виродження культури" [11].

2.4. Використання індукованого мутагенезу

Індукований мутагенез включає впливи: фізичні (температура, різні види випромінювань), хімічними речовинами (інгібітори синтезу прекурсорів нуклеїнових кислот; алкілюючі сполуки; окисники; розширювачі ланцюгів ДНК; інгібітори синтезу ДНК; речовини комплексної дії), обробка культури мутагенами.

Простим і зручним способом отримання мутантів різних типів є ультрафіолетове опромінення ($\lambda=253,7$ нм), проте високі частоти мутацій досягаються за низького виживання бактерій. За хімічного мутагенезу його інтенсивність залежить від концентрації мутагену в суспензії, експозиції та температури. Підбір дози мутагену визначається кількістю колоній, вирощених в агарі після впливу. Виживання залежить від дози мутагену та чутливості мікроорганізму до наслідків, Чутливість штамів різниться, для селекційної роботи використовують дози, що гарантують виживання від 0,1 до 50-80% [3].

Найвищу летальність та мутагенну активність проявляють УФ-опромінення ($\lambda=260$ нм) за максимального поглинання УФ-світла ДНК. Експерименти *in vitro* показують, що пурины стійкіші до хімічних змін, спричинених УФ променями, а піримідини змінюються у 2-х напрямках: гідратація (біологічно неважлива) та утворення димерів піримідину (викликає важкі порушення реплікації ДНК).

Фізичні фактори впливають на водні суспензії спор або клітин. За обробки хімікатами дотримуються умов, сприяючих максимальній експресії їх мутагенної активності. рН розчину є важливим фактором процесу, тож обробку здійснюють у буферному розчині у найефективнішим для мутантних значень рН. У разі хімічних мутацій дозування характеризують концентрацією мутації в суспензії та експозицією за певної температури. Добре вивченим мутагеном є нітратна кислота, яка викликає окисну дезамінацію азотних основ ДНК [11].

Відома статева регуляція гена, відповідального за фітоен-дегідрогеназу. У спарених культурах транскрипти *carB* і *carRA*, структурних генів для каротеногенезу, є ряснішими, ніж в одиночних культурах [5], дане збільшення гальмується ацетатом.

Для *N. crassa* і *M. circinelloides* показано світлову індукцію збільшення транскрипції генів, що кодують ГППФ-синтазу [36]. Модифікувати біосинтез, принаймні на завершальних стадіях, здатні дифеніламін (гальмує утворення пігментів, блокує метаболічний ланцюг на рівні фітону) та йонони та природні терпеноїди (підсилюють утворення β -каротину). Інші активні продукти відносять до обмеженої групи, що блокують синтез на рівні лікопену та скасовують дію йононів через інгібування дегідрогенази [44]

Перевиробництво каротиноїдів (вторинних метаболітів) збільшує метаболічне навантаження хазяїна та знижує ріст клітин. Процес полегшується за динамічного управління модулями для розділення клітинних процесів на фазі росту (досягається висока щільність клітин) та фазі виробництва (зосереджена на надвиробництві каротиноїдів). Для отримання високої щільності клітин використовують вільну від індукторів/репресорів послідовну стратегію контролю, яка пригнічує біосинтез каротиноїдів у фазі росту за допомогою промотору глюкозорепресії. За споживання глюкози під час фази росту активізується каротиноїдний синтез, тож можна досягти надвиробництва каротиноїдів без шкоди для клітинної щільності (до 1156 мг/л β -каротину в біореакторі).

2.5. Використання гібридизації для створення промислових продуцентів біологічно-активних речовин

Гібридизація (генетична рекомбінація) – перерозподіл генів для об'єднання властивостей двох чи більше організмів в один гібридний геном. Рекомбінація відбувається кількома шляхами: статеві та напівсполучні процеси еукаріотичних мікроорганізмів, кон'югація, перетворення та трансдукція в прокаріоти, злиття протопластів. Основною перевагою методу є можливість комбінування.

Трансформація – передача генетичної інформації з клітин донора до реципієнта. ДНК спочатку адсорбується на поверхні клітини, надалі поглинається. Триває відбір хромосомної ДНК та хромосом реципієнта – процес після комбінації. Кількість ДНК становить близько 10 т.п.н. інформації, можливої до передачі.

Трансформація здатна проходити як *in vitro*, так і за рахунок ДНК, спонтанно виділеної із клітини без участі дослідника. Вихід ДНК із клітини обумовлюється переважно автолізом та за природної трансформації, бактерія-донор ДНК обов'язково гине. Природна трансформація є одним із природних способів горизонтального перенесення генів [28].

Трансдукція – передача хромосомних генів чи плазмід від клітин-донорів, що містять бактеріофаг, до клітин-реципієнтів. Під час неї хромосомні / плазмідні фрагменти упаковуються в головку бактеріофага та, виходячи у складі цих частинок із клітин-донорів в результаті їх лізису, потрапляють до інших клітин згідно нової інфекційної поведінки. Білкова капсида фагової головки захищає ДНК від руйнування нуклеазами, тож трансдукція ДНК є більш захищеною. Недоліком механізму є передача інформації лише між бактеріями одного виду. При трансдукції розмір доставленої інформації визначається розміром головки бактеріофага (від 20 до 40 т.п.н.), тож окремі гени та спеціальні маркери доставляються під час трансформації.

Кон'югація – обмін генами, що включає передачу інформації від донорів до реципієнтів шляхом прямого контакту за допомогою плазмиди кон'югації. Процес передачі хромосомних генів під час кон'югації може відбуватися за

участю транспозонів кон'югації, розташованих на хромосомі.

Найефективнішим механізмом є горизонтальний перенос генів у всіх середовищах проживання бактерій, перевагою якого є можливість систематичної кон'югації віддалених мікробів. Кількість доставленої під час кон'югації ДНК є більшою, ніж за трансформації та трансдукції, можна перенести навіть всю хромосому в слабких умовах спаровування [28].

Загальними рисами всіх методів обміну генетичною інформацією бактеріями є: процес передачі ДНК завжди односторонній / однонаправлений, донорів до реципієнтів. Відсутній повний обмін генетичною інформацією, тож утворюється мезозот. Для утворення рекомбінантного потомства перенесення гена має закінчуватись рекомбінацією.

Сучасним методом отримання продуцентів із заданими ознаками є генна інженерія, суть якої зводиться до спрямованої побудови генетичної системи поза організмом та подальшого впровадження її в живий організм. У такому випадку рекомбінантна ДНК стає частиною генетичного апарату реципієнта, надаючи йому нових корисних генетичних, фізіологічних та біохімічних властивостей. Основними інструментами генної інженерії для об'єднання, синтезу, виявлення та аналізу генів є впливаючі на ДНК ферменти, векторні системи доставки генів та штучні олігонуклеотиди (лінкери, адаптери, праймери, промотори, зонди). Традиційні методи створення вихідного матеріалу (штучний мутагенез, гібридизація) обмежуються рамками одного чи суміжних видів, в той час як генна інженерія поєднує генні детермінанти видів, навіть дуже віддалених за геномом.

З допомогою генної інженерії отримують рекомбінантну ДНК з генних фрагментів різних організмів, копіюючи штучні молекули з допомогою векторів (плазмідних чи вірусних ДНК) для введення у клітини реципієнтів, моделюючи процес на рівні ДНК. Такі методи не застосовуються масово через їх високу матеріальну вартість, час та складність.

2.6. Схема отримання продуценту, що використовувались у роботі

Штами: *B. trispora* K2 (-) дикий штам та *B. trispora* K2 (+) дикий штам.

Підготовка культурального середовища. Всі розчини та носії готуються на дистильованій воді. Описані культуральні середовища спочатку розроблялись для штамів *P. blakesleeanus* та є підходящими для *B. trispora*.

1. Мінімальний агар: готують два окремі розчини. Розчин А: 20 г D-глюкози, 15 г агару в 500 мл дистильованої води. Розчин В: 2 г L-парапарагіну H_2O , 5 г KH_2PO_4 , 0,5 мг $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 20 мл основного розчину мікроелементів в 500 мл води. Автоклавують окремо за надлишкового тиску 100 кПа (близько 1 атм) 20 хв, добре перемішують та використовують.
2. Мінімальний агар підкислюють до рН 3,4 за допомогою HCl після автоклавовання та перемішування розчину А та розчину В.
3. Основний розчин мікроелементів (50 мл): 2,8 г/л $CaCl_2$, 0,05 г/L- тіамін HCl, 0,1 г/л лимонної кислоти H_2O , 75 мг/л $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$, 50 мг/л $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 15 мг/л $MnSO_4 \cdot H_2O$, 2,5 мг/л $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ і 2,5 мг/л $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ у воді. Для тривалого зберігання за кімнатної температури додають кілька крапель хлороформу.
4. Багатий агар: Мінімальний агар з додатковим 1 г дріжджового екстракту в розчині А.
5. Багатий агар, кислота: багатий агар, підкислений до рН 3,4 за допомоги HCl після автоклавовання та змішування розчину А та розчину В.
6. Картопляно-декстрозний агар: відварюють 200 г свіжої, очищеної і нарізаної кубиками картоплі у 1,5 л води 1 год. Проціджують, додають до екстракту 20 г D-глюкози, 1 мг тіаміну HCl і 15 г агару. Доводять об'єм до 1 л дистильованою водою. Застосовують і зневоднений агар-декстрозний агар.

2. Різне

1. Основний розчин N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідину (МННГ) готують під витяжкою. Наливають кілька міліграм МННГ в попередньо зважену пробірку, водою концентрацію до 1 мг/мл. Пробірку щільно закривають, струшують для прискорення розчинення, поміщають аліквоти ~ 0,2 мл в стерильні пробірки Еппендорфа ємністю 1,5 мл, зберігають замороженими в темряві до використання. Розчин жовтий і знебарвлюється, якщо сполука

інактивована; поглинання 1 мг/мл розчину при $\lambda=400$ нм через 1-см світловий шлях. Розморожені аліквоти не використовують повторно.

2. Розчин тіосульфату натрію: 20 г/л $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$.

3. Розчин Твін-80: 1 мл/л поліоксиетиленового сорбітану моноолеат у воді, стерилізований в автоклаві.

3. Споривий урожай. Спори збирають зі споруваних культур через 4-5 днів після інкубації на мінімальному агарі при 30°C обережним промиванням міцелійної поверхні стерильним розчином Твін-80. Отриману суспензію спор центрифугують при 2000g чи більше 1 хв. Промивають спорову пелету двічі стерильним розчином Твін-80 і ресуспендують у стерильному розчині Твін-80.

4. Збереження штаму. Споріві суспензії в розчині Твін-80 втрачають життєздатність за $t=4^\circ\text{C}$ за кілька днів. Для тривалого зберігання при $t= -20^\circ\text{C}$ додають стерильний гліцерин до концентрації 200 мл/л. Штам зберігається як ліофіли. Стерилізують ліофільні пробірки після розміщення в них етикетки з назвою штаму та бавовняної пробки. Суспендують спори в стерильний білковий розчин (сироватка крові, розчин альбуміну сироватки, відновлене з порошку нежирне молоко), додають 0,5 мл в кожен пробірку, дотримуються вказівок ліофілізатора для заморожування (при t близько -50°C), висушують при кількох Па, запаюють. Зазначають назву штаму на зовнішніх наліпках, зберігають у холодному приміщенні чи за кімнатній температурі.

5. Культивування штаму. Розкладають 10^4 спор на пластинах з мінімальним агаром, інкубують в темноті впродовж 4 днів при 30°C для росту, та 23°C для спороношення; генетичні процедури здійснюють за кімнатної температури.

6. Мутагенез. Готують стаканчик (500 мл) з 200 мл розчину тіосульфату натрію. Центрифугують 1 хв при 2 000 g чи більше дві аліквоти суспензій спор із вмістом у кожній нещодавно зібраних 5×10^6 життєздатних спор/мл. Ресуспендують пелети в 0,95 мл Твін-80 розчину в стерильних пробірках Еппендорфа (2 мл). Відбирають 50 мкг від кожної пробірки до пробірки для

розведення з розчином Твін-80 для розрахунку життєздатних спор на мінімальному агарі. Додають 0,1 мл розчину Твін-80 в одну з пробірок і 0,1 мл Розчину МННГ до іншої та інкубують впродовж 30 хв за 30°C у темряві, м'яко струшуючи. Фінальна концентрація МННГ становитиме 0,1 г/л. Забруднений наконечник мікропіпетки розміщують у розчині тіосульфату.

По завершенню інкубації відбирають 50 мкл з кожної пробірки для розрахунку життєздатних спор, центрифугують решту 1 хв. Позбавляються від контрольної пробірки. Проциджують супернатант у розчині тіосульфату натрію, повторно суспендують пелети спор в 1 мл розчину Твін-80, струшують, центрифугують знову. Ресуспендують гранули спор в 1 мл розчину Твін-80, струшують, розкладють аліквоти 50 мкл L на планшетах з агаром, багатим кислотою. Інкубують пластини в темряві при 30°C 4-8 діб.

7. Скринінг та очищення мутантів. Визначають передбачувані мутантні колонії, пересівають їх окремо на кислотному агарі при 30°C у темряві. Прищепкою можуть слугувати фрагменти міцелію, вирізані кінчиками ниткових пінцетів чи спори, передані стерильними зубочистками. Аналогічну маніпуляцію здійснюють із колоніями диких типів для контролю. Вирощують колонії кожного передбачуваного мутанта поширенням спори на кислотному агарі для отримання окремих колоній. Перевіряють фенотип та субкультуру ще хоча б раз. За неоднорідності колоній субкультурують до однаковості всіх колоній у морфології, зростанні та кольорі. Спори збирають та зберігають під постійними ідентифікаційними номерами та генотипом.

8. Побудова міжстатевих гетерокаріонів. Інокують міцеліальні фрагменти двох різностатевих штамів на протилежних сторонах картопляно-декстрозних агарових пластин. Інкубують пластинки в темряві до появи яскраво-жовтих смуг по лінії зустрічі міцеліїв. Переносять міцеліальні фрагменти від яскраво-жовтих смуг на мінімальний агар. Після інкубації в темряві перевіряють на наявність частин міжстатевих міцелію. Субкультурують міцеліальні фрагменти міжстатевих міцелію на пластинах мінімального агару, шукають відносно рівномірний яскравий колір та оксамитовий вигляд. Зберігають міжстатевий гетерокаріотичний міцелій.

9. Сегрегація та очищення міжстатевих гетерокаріонів. Поміщають невеликі фрагменти міжстатевого міцелію в стерильну пробірку Еппендорфа з 0,2 мл стерильного 0,55 М розчину сорбіту та 20-25 мг стерильного морського піску, енергійно струшують у вихровому міксері. Тричі струшують по 20 с, тримаючи пробірку в льоду між струшуваннями. Перевіряють гіфальне руйнування під мікроскопом, за необхідності повторюють. Розводять ~ 40 мкл струшеної суспензії на пластинах мінімального кислотного агару, інкубують 4 доби у темряві. Утворені колонії неоднорідні, від гомо- до гетерокаріонів з різними пропорціями складових штамів. Обирають та зберігають окремі колонії. Можливо пересівати міцеліальні фрагменти допоки вони не стануть однорідними за кольором.

2.7. Особливості технології або апаратурного оформлення у зв'язку з використанням обраного продуцента

У виробництві β -каротину головною складністю є застосування етилацетату та етанолу для екстракції готового продукту та подальше очищення відходів від даних розчинників. Регенерацію відпрацьованого органічного розчинника здійснюють лужною обробкою, паровою перегонкою та дистиляцією.

Органічні розчинники – легкозаймісті вибухові речовини, їх пари згубно впливають на здоров'я людини. З огляду на це за використання способу витяжки використовують герметичне технологічне обладнання, оснащене вибухозахищеними електродвигунами, антистатичними пристроями, брандмауерами повітряних трубопроводів. Виробничі приміщення мають бути обладнані сильною механічною вентиляцією постійного струму, подачею протипожежної рідини, спеціальними засобами протипожежного та санітарно-гігієнічного обладнання.

Технологічною особливістю виробництва каротиноїдів є велика кількість відходів (міцелій, шлами). Об'єми циркулюючої води, розчинників та реагентів утворюють значну кількість стічних вод. Використання відходів вимагає попередньої обробки, а скидання або використання стічних вод – хімічної та бактеріальної обробки.

3. ВЛАСНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1. Характеристика кінцевої продукції виробництва

β-каротин (міжнародна назва: β-carotene) використовується у низці галузей господарювання. У харчовій промисловості сполуку додають у кондитерські, хлібопекарські, молочні вироби для стабілізації та поліпшення органолептичних показників. У фармакології β-каротин є безпечним барвником для ліків за умови додаткового очищення чи стерилізації, адже дана технологія продукує нестерильний препарат. Додаючи допоміжні речовини, розчиненні в оліях чи створенні вододисперсних форм, створюють пероральний препарат у капсулах із широким спектром захисної та відновлювальної дії для лікування дерматологічних захворювань та дефіцитних станів. У науковій роботі препарат потребує додаткового вивчення щодо встановлення деталей його протипухлинного та антиоксидантного впливу.

Наразі товарна форма препарату має ступінь очищення на рівні 95%, вміст вологи – 5%. Нестерильний буро-червоний кристалічний порошок, нерозчинний у воді та погано розчинний у етанолі. Випускають β-каротин у скляних банках об'ємом 1000 мл по 1 кг порошку у кожній чи флаконах із скломаси, укупованих гумовою пробкою. Пакування – банки партіями по 10 штук у картонних упаковках.

Пакувальні матеріали маркують печаткою або тисненням, що має бути чітким, стійким до вигорання та видалення [17]. Кожна пакувальна одиниця має мати етикетку з паперу етикетного чи письмового, виготовлену поліграфічно (ТУ У 21521832.001) чи тисненням та містити наступні позначення: товарний знак і назва підприємства-виробника, його адреса і місце виготовлення; назва продукту; дата виготовлення; умови зберігання; термін придатності до споживання; маса нетто порошку (в г); кількість пакувальних одиниць (для групової тари); позначення технічних умов.

Кінцевий товар перевозять в герметичних транспортних засобах і контейнерах усіма видами транспорту відповідно до транспортних правил та

додаткових вимог, зазначених у документації на кінцевий товар. Біологічно активну добавку β -каротин зберігають в сухому, добре провітрюваному складі за $t \leq +25^\circ\text{C}$ та відносній вологості повітря нижче 75%.

3.2. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, застосованих у виробництві

Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що застосовують у виробництві β -каротину, наведено в таблиці 1.

Таблиця 1. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів

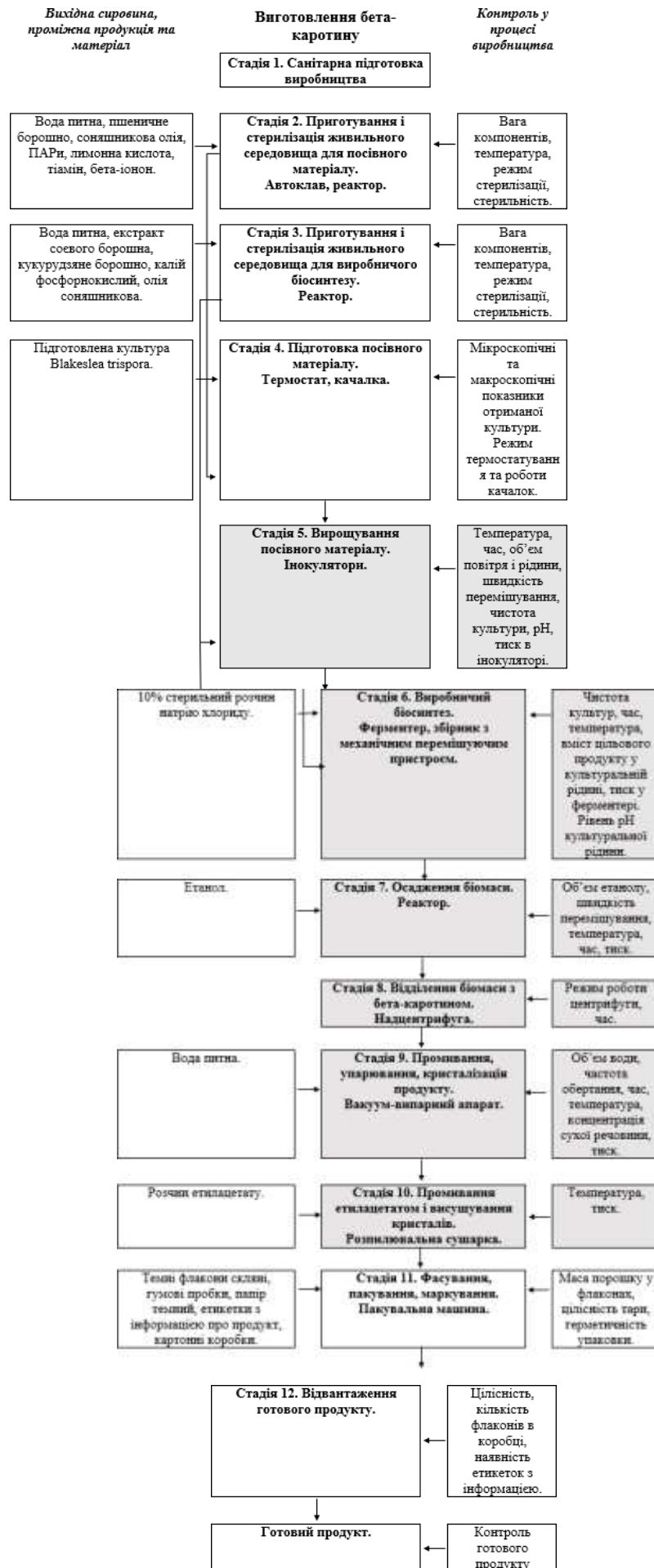
Найменування	Показники, що обов'язкові для перевірки та їх нормативне значення	Примітки
1. Основна сировина		
Агар Сусловий	Масова частка золи (в Перерахунку на суху речовину) не менше 2%; не допускається присутність йоду і важких металів	Компонент ПС для відновлення музейної культури
Борошно соєве	Вологість не більше 9%, інші показники згідно ДСТУ	Компонент поживного середовища
Борошно кукурудзяне	Вологість не більше 15%, інші показники згідно ДСТУ	Компонент поживного середовища
Етилацетат	Масова частка етилацетату не менше 99%	Екстрагент
Калій фосфорнокислий одно заміщений	Масова частка калію фосфорнокислого не менше 99,5%	Компонент поживного середовища
Меляса	Усі показники згідно вимогам ДСТУ	Компонент поживного середовища
Олія соняшникова	Масова частка нежирових домішок, не більше ніж 0,01%	Компонент поживного середовища
Патока крохмальна	Масова частка сухої речовини не менше 78%;	Компонент поживного середовища
2. Допоміжна сировина		
Вода питна	pH 6,0-9,0; хлориди – не більше 350 мг/дм ³ ; жорсткість загальна – не більше 7 моль/дм ³	Холодо- і теплоагент; для миття та ополіскування обладнання, приготування поживних середовищ
Засіб миючий синтетичний порошкоподібний	Вміст активного хлору 4,86%	Для миття обладнання та приміщень
Кислота соляна	Масова частка соляної кислоти не менше 35-38%	Для регулювання кислотності культуральної рідини

Натр їдкий технічний	Масова частка гідроксиду натрію не менше 42%	Для регулювання кислотності, нейтралізації стічних вод та етилацетату
Перекис водню	Масова частка перекису 30%-40%	Для дезінфекції обладнання та приміщень
Спирт етиловий	Об'ємна частка етилового спирту не менше 96,3%	Екстрагент
Тіаміну хлорид	Вологість не більше 10%, інші показники згідно ДСТУ	Компонент поживного середовища
Шрот кукурудзяний	Вологість не більше 9%, інші показники згідно ДСТУ	Компонент поживного середовища
Штам <i>V.Trispora K2 (+)</i> та <i>K2 (-)</i> .	Морфологія, характерна для даного продуценту, без присутності сторонньої мікрофлори	Посівний матеріал
3. Матеріали		
Гумові пробки	Маркування, цілісність	Пакування готової продукції
Картонні коробки	Маркування, цілісність	Вторинна упаковка по 10 флаконів
Тканина фільтрувальна	Усі показники у відповідності з ДСТУ	Підготовка повітря
Флакони скляні	Маркування, цілісність, відсутність сторонніх включень	Пакування готової продукції
Напівпродукти		
Посівний матеріал	Мікробіологічна чистота	Для засіву ферментера

3.3. Опис технологічного процесу

Технологія виробництва β -каротину включає принципові стадії: підготовка посівного матеріалу; підготовка поживного середовища, виробничий біосинтез; виділення та очистка β -каротину (рис. 7).

Санітарна підготовка виробництва – робочий і підготовчий блок для забезпечення препаратів регульованою якістю, включає навчання персоналу, підготовку розчинів для очищення та дезінфекції, підготовку виробничих приміщень, обладнання та комунікацій, підготовку робочих розчинів, підготовку повітря та води. Санітарну підготовку виробничих та технічних процесів здійснюють згідно вимог GMP, ДСанПН та чинних стандартів у галузі фармацевтики та біотехнології [17].

Рис 7. Технологічна схема отримання β -каротину.

Підготовка персоналу включає інструктаж з безпеки та навчання здоров'я. Належну гігієну здійснюють регулярними перевірками стану здоров'я не рідше одного разу на рік чи регулярні медичні огляди осіб із хронічними захворюваннями за необхідності.

Всі працівники біотехнологічної галузі проходять навчання з безпеки, а до початку роботи – навчання та регулярну перепідготовку в процесі. Важливою вимогою є належний рівень кваліфікації працівників, набуття необхідних навичок для забезпечення відповідного рівня та знань відповідних етапів виробництва. Персонал регулярно має проходити професійне навчання з дисциплін, пов'язаних із виробництвом продукції. Дотримання даних вимог знижує вірогідність випуску бракованої продукції та створення аварійних ситуацій через некоректні дії персоналу [17].

Підготовка дезінфікуючих та миючих розчинів. Персонал та обладнання належно обробляються дезінфікуючими засобами для зниження ризику зараження цільового продукту, відповідно до вимог GMP.

Дезінфікуючі розчини для обробки пристроїв та будівель готують відповідно до «Методичних рекомендацій щодо приготування і застосування робочих розчинів мийних, дезінфекційних, мийно-дезінфекційних засобів та антисептиків» затверджених Наказом МОЗ України від 14 грудня 2001 р. № 502.

Антисептичні розчини готують відповідно до правил особистої безпеки, надягають гумові рукавички, окуляри, марлеві пов'язки. Після приготування дезінфікуючий розчин зберігають обмежений час у спеціальній ємності для попереднього миття, яку використовують для відбору проб для підтвердження мікробіологічної чистоти [17]. Для обробки виробничих приміщень, обладнання та комунікацій готують розчин пероксиду гідрогену та миючий розчин порошку синтетичного порошку.

Розчин пероксиду гідрогену готують шляхом розведення 33% розчину у збірній воді з питною водою за допомогою перемішувального пристрою для утворення 6% пероксиду при 40 об/хв з подальшим зберіганням дезінфікуючого розчину в спеціальному контейнері впродовж для

подальшого одночасного використання з миючим розчином для обробки промислових будівель та обладнання.

Розчин миючого засобу готують одноразовим у збірнику з перемішувальним пристроєм, розчиняючи певну кількість синтетичного порошкового миючого засобу у питній воді за $t = 40-50^{\circ}\text{C}$ та перемішуванні при 40 об/хв.

Підготовка виробничих приміщень, обладнання та комунікацій здійснюється відповідно до «Методичних рекомендацій щодо підготовки виробничих приміщень» затверджених Наказом МОЗ України від 14 грудня 2001 р. № 502. Виробничі приміщення, зовнішня поверхня пристрою та обробка зв'язку обробляється миючим розчином, а потім дезінфікуючим та чистим водою. Відходи рідкої та промивної води потрапляють у стадію очищення відходів. Для запобігання появі стійких форм мікроорганізмів дезінфікуючий розчин періодично замінюють. Контролюють кількість пилу та концентрацію мікроорганізмів у повітрі виробничих приміщень.

Підготовка виробничих приміщень включає щоденне прибирання виробничого приміщення після кожної зміни. Підготовка обладнання та комунікацій здійснюється до і після технологічного процесу. Ці робочі блоки включають очищення, обробку обладнання дезінфікуючими засобами та зв'язок із подальшим очищенням.

Мийка вузлів обладнання здійснюється теплим розчином синтетичного миючого засобу ($t=40^{\circ}\text{C}$), використовуючи поролонові губки, серветки із зачепленими краями з безворсової тканини. Зйомні частини обладнання, які безпосередньо контактують із сировиною та проміжними продуктами, знімають, розбирають і миють розчинами миючих засобів та водою питною. Ополіскування обладнання проводиться водою питною з обов'язковим візуальним контролем якості відмивки. Відпрацьовані розчини та промивні води надходять до стадії знешкодження відходів.

Дезинфекція обладнання (повна) обладнання і комунікацій здійснюється 1-2 рази в рік розчином перексиду гідрогену 6% чи іншим дозволеним антисептиком. Для дезінфекції обладнання його повністю заповнюють

дезінфікуючим розчином і витримують за $t=55-65^{\circ}\text{C}$ 1,5-3,0 год. Знімні частини зберігаються в дезінфікуючому розчині в умовах, аналогічних дезінфекції обладнання. Щоденна дезінфекція проводиться шляхом обробки зовнішньої поверхні обладнання та візуального контролю якості обробки для зв'язку з дезінфікуючими розчинами перекису водню та питною водою.

Стерилізація обладнання включає вологу термообробку водою і паром.

Підготовка вентиляційного повітря. Промислове повітря очищується відповідними фільтрами, та, відповідно до GMP у фармацевтичному виробництві, багатоступеневою фільтрацією. При цьому забезпечується стиснення повітря для подолання опору повітропроводів та арматури, видалення пилу та твердих часточок, усунення та знищення залишкових мікроорганізмів, контроль температури та вологості.

Забір повітря здійснюється із атмосфери через повітрозбірник ЗП-29, через 20-30 м розташовують впускний вал зі стабілізованою концентрацією мікроорганізмів. Параметри повітря (температура, вологість, кількість пилу та мікроорганізмів) різняться залежно від пори року, погодних умов, географічного розташування підприємства та висоти забору повітря.

Механічне очищення повітря здійснюється фільтром грубого очищення для видалення механічних часточок розміром понад 5 мкм, що попереджує забруднення вентилятора та знижує кількість забруднень. Стільникові фільтри очищують від грубого пилу, часто їх заповнюють фільтруючими матеріалами, у даній технології – вінілопластиковою сіткою, що є надійними та зручними за виробництва вітамінів. Діаметр пор фільтруючого матеріалу у фільтрі попереднього очищення F-30 становить 5-10 мкм.

Нагнітання повітря за проходження через вентилятор В-31 відбувається при тиску 0,2 МПа.

Кондиціонування та стабілізація параметрів повітря. За надходження в нагрівальну колону НК-32 через вентилятор В-31 повітря надають температуру 20°C та вологість 40-60%, на вході гарячої пари та у точці скиду конденсату розташовують клапани. Процес завершується у повітряному

фільтри Ф-33 з діаметром пор фільтруючого матеріалу 1,5 мкм, де повітря очищують дрібними пиловими часточками та мікроорганізмами із системи попереднього очищення та подальшою подачею в будівлю.

Підготовка стерильного повітря. Забір атмосферного повітря проводять за допомогою забірника ЗП-22 діаметром 300 мм на висоті 20-30 м. Забране повітря під тиском проходить через фільтр попередньої очистки Ф-23, де видаляються часточки з розміром понад 10 мкм. Після очищення повітря нагнітається насосом Н-24 під тиском 0,2 МПа.

Видалення вологи з повітря здійснюють охолодженням до $t=15^{\circ}\text{C}$ в кожухотрубному теплообміннику ТО-25, надлишкова волога видаляється через значну різницю температур.

Стабілізація термодинамічних показників повітря відбувається у ресивері РС-26, де проходить зниження пульсації тиску, видалення залишків масляного туману. Електроприводні запірні клапани та зворотні клапани (розташовані на вході гарячої пари, на виході конденсату приймача та на виході використаної пари) встановлюються як приймачі в лінії подачі повітря. Повітря залишає приймач за $P=0,2$ МПа та $t=20^{\circ}\text{C}$.

Очищення повітря на головному фільтрі здійснює стерилізацію повітря від дрібних пилових частинок та мікроорганізмів, після стабілізації в приймачі повітря надходить у типовий фільтр типу НЕРА 11 F-27 з чистотою 95% для затримки частинок розміром до 1,5 мкм.

Очищення повітря на індивідуальному фільтрі типу ФТО-60 Ф-28 затримує часточки розміром до 0,5 мкм, видаляється до 99,999% мікроорганізмів та спор. Окремі фільтри застосовують фільтруючі матеріали на основі базальтового надтонкого волокна, базальтової мікроволокна, синтетичного волокна. За очищення повітря тиск у системі контролюється, різниця вказує на мікробне забруднення або наявність механічних часточок. Після промивання стерильне повітря вводять в прищепи інокуляторів І-4 та І-6 та ферментатора ФВ-8 для провітрювання культури продуцента.

Підготовка робочих розчинів

Титруючий розчин для стабілізації рН культури (10% розчин HCl).

Розчин додають через дозатор колектора з перемішуючим пристроєм, додаючи кислоту та питну воду при 40 об/хв з подальшим перемішуванням до утворення 10% розчину HCl, зберігають в спеціальних ємностях.

Підготовка тари включає миття м'якими розчинами, ополіскування водою питною та сушіння впродовж 1 год.

Підготовка поживних середовищ. Основу середовища складають пшеничне борошно, рослинна олія, піногасники (ПАВи), антиокисники (лимонна кислота), вітаміни (тіамін) та стимулятори росту (β -іонон). Для першої генерації додають соняшниковий шрот 8-12%, мелясу 1-2%, KH_2PO_4 0,05%, баковий відстій 4-5%, тіаміну хлорид 0,0002% за рН=6,0-6,5. Для другої генерації додають борошно соєве 2,3%, кукурузне 4,7%, KH_2PO_4 0,05%, рН 6,1-6,5. Середовище для вирощування посівного матеріалу у колбах готують у колбах К-2 та стерилізують в автоклаві за $t=121\pm 1^\circ\text{C}$ та 0,1 МПа надлишкового тиску впродовж 30 хвилин.

Для вирощування посівного матеріалу готують поживні середовища з подальшою стерилізацією проводять в 2 інокуляторах об'ємом 0,63 м³. Кількість (-)форм має переважати (+) форми у 10 разів (10:1). Вирощування здійснюють на уніфікованому середовищі з дешевими відходами крохмалепатокового виробництва у складі (зелена кукурудзяна патока, кукурудзяний екстракт як джерело фосфору, вітамінів, нітрогену). Середовище для ферментації додатково містить ~ 2,0 % рослинної олії для каротиноутворення. Поживні середовища для інокуляції та ферментації містять ~ 85–90 мг% амінного нітрогену та ~ 1,0 % редукованих цукрів; рН середовища після стерилізації має становити 5,9–6,3. Питну воду завантажують в інокулятор, додають необхідні компоненти середовища при перемішуванні у відповідній кількості дозатором Д-5. Перемішують за 30-40 об/хв впродовж 30 хвилин після введення всіх компонентів середовища, охолоджують до $t=30^\circ\text{C}$, стерилізують при $P=0,3$ МПа та $t=120^\circ\text{C}$ 30 хв «гострою» парою та подають охолоджуючу воду до кожуха інокулятора.

$P > 0,05$ МПа. Контролюють мікробіологічну чистоту середовища висіванням проб у чашках Петрі з подальшим інкубуванням у термостаті.

Підготовка поживного середовища для виробничого біосинтезу

Як середовище виробничого біосинтезу каротину у ферментері було обрано модифіковане середовище Циглера наступного складу, г/л: зелена кукурудзяна патока та екстракт соєвого борошна 2,3%, кукурудзяного 4,7%, K_2HPO_4 0,05%, ~ 4,0 % рослинної олії, вода, $\text{pH}=5,9-6,3$ [8]. Процес потребує попереднього *приготування екстракту соєвого борошна* в змішувальному реакторі. Після подачі до пристрою питної води у реактор додають соєве борошно, за t та змішування 30-40 об/хв зі швидкістю 100 г/л води. Екстракт готують перемішуванням та кипінням при 120°C впродовж 30 хвилин.

Центрифугування екстракту соєвого борошна здійснюють впродовж 10 хв при 5000 об/хв., осад подають на етап знешкодження відходів, відділений екстракт є компонентом поживного середовища виробничого біосинтезу.

Приготування та стерилізація композиції поживного середовища. Стерилізацію проводять у ферментері Фв-6. Питомий об'єм екстракту соєвого шроту завантажують у ферментер. За перемішування 30-40 об/хв. впродовж 30 хв. використовують дозатор для завантаження компонентів середовища. Стерилізацію проводять за $t=125^\circ\text{C}$ 15 хв при 0,3 МПа «гарячою» парою, воду з-під ферментації подають в кожух ферментера для охолодження середовища до $t=30^\circ\text{C}$. Надлишковий $P \geq 0,05$ МПа. Після стерилізації компонентів стерилізований водний розчин лимонної кислоти (антиоксидант) вводять у ферментер через систему шлангів, компоненти знову перемішують. Мікробну чистоту середовища контролюють висіванням зразка у чашку Петрі, інкубують у термостаті, перевіряють та стабілізують pH до 6,1-6,5, додаючи за необхідності розчин HCl чи NaOH .

Підготовка посівного матеріалу. Вміст флакону із кріоконсервованою культурою висівають у стерильних умовах у пробірки з суловим агаром, інкубують 7 діб при $t=28^\circ\text{C}$ у термостаті без світла. Опісля перевіряють мікробну чистоту для візуальної оцінки культурних характеристик агента

(розмір, форма, край, поверхня, колір, колоніальна прозорість), мікроскопічні та морфологічні характеристики.

Вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках. Після додавання 2 мл стерильного поживного середовища у пробірку з посівом на твердому середовищі, перемішують для утворення клітинної суспензії у колбі 0,75 л за стерильних умов. Колбу поміщають у термостат, ставлять на качалку зі швидкістю 200 об/хв., інкубують 28-56 годин за $t=28^{\circ}\text{C}$, візуально контролюють мікробну чистоту.

Для *вирощування посівного матеріалу в інокуляторі* посівний матеріал із колб по завершенню вирощування в термостаті системою стерильних шлангів передають у підготовлені інокулятори із стерильним середовищем через попередньо обпалений стерильний штуцер для кінцевого накопичення посівного матеріалу. Об'єм апарату – $0,63 \text{ м}^3$, коефіцієнт заповнення 0,5. Процес в інокуляторах здійснюється за $t=28^{\circ}\text{C}$ 36-72 год. Інокулятори оснащують механічним змішувальним агрегатом (відкрита турбінна мішалка і барботер), при 200 об/хв. Після завантаження культури в інокулятор вміст перемішують мішалкою 2 хвилини, відбирають у стерильну ємність певний об'єм культури для досліджень мікробіологічної чистоти та рівня рН.

Виробничий біосинтез здійснюється після закачування посівної рідини з інокуляторів у ферментер у кількості 5% від об'єму живильного середовища, попередньо завантаженого в пристрій та стерилізованого стерильною шланговою системою. Виробничий ферментер – циліндрична ємність об'ємом $6,3 \text{ м}^3$, коефіцієнт наповнення – 0,6. Ферментер Фв-8 оснащений механічним змішувальним пристроєм, відкритою турбінною мішалкою зі швидкістю $3,33 \text{ с}^{-1}$, що створює необхідні для біосинтезу та генерації масових та обмінних потоків енергії умови. Аерація культури здійснюється вторинним диспергатором, розміщеним під мішалкою, через який очищене технологічне повітря подається через фітинги. Біосинтез відбувається за $t=28^{\circ}\text{C}$, по завершенню вміст цільового продукту становить 2000 мг/л.

Після завантаження культури у ферментер вміст апарату перемішують

мішалкою 2 хв, відбирають у стерильну ємність об'єм культури для дослідження мікробіологічної чистоти.

Стандартизація рН культуральної рідини здійснюється рН-метром та доводиться до рівня 6,5 по завершенню біосинтезу у ферментері та подачі культуральної рідини через штуцер нижнього спуску у збірник із механічною мішалкою для корегування кислотності. Корекцію рН здійснюють подачею 10% розчину HCl через дозатор із подальшим перемішуванням культуральної рідини мішалкою та повторним визначенням рівня рН.

Екстрагування продукту з культуральної рідини. Нейтральна рН-культура подається до змішувального реактора $V=5\text{м}^3$ насосом, де вилучають каротин з культури впродовж 3 год) та за використання вибухонебезпечного токсичного екстрагованого етанолу. До реактора подають етанол (розчинник) із композиції в об'ємі, рівному об'єму культурального середовища, через дозатор. Процес супроводжується перемішуванням ($3,33\text{ с}^{-1}$) впродовж 3 год при $t=85^\circ\text{C}$, що потребує контролю затягування та тиску пристрою.

Відділення екстракту центрифугуванням. У результаті екстракції каротин та супутні біологічно активні речовини переходять із культуральної рідини у етанол, тому необхідно розділити тверду (біомасу) та легку (етанолову) фази. Апаратурне виконання процесу включає надцентрифугу, куди надходить нерозділений екстракт. Надцентрифуга для відділення рідини включає верхню та нижню кришки у вигляді пластин, засоби для подачі вхідної суспензії внизу ротора та засоби для скидання очищеної рідини вгорі. Вхідна рідина через канал надходить у роздільну камеру з ротором, під впливом відцентрового силового поля тверді частинки осідають на внутрішній поверхні стінки ротора з антифрикційним покриттям, а очищена рідина виводиться через отвори у поршні та верхній кришці. Після зупинки ультрацентрифуги накопичений на внутрішній поверхні ротора осад видаляється поршнем [17]. Центрифугування триває 10 хв. при 3000 об/хв, рідину та осад видаляють для подальшого виділення залишків етанолу і культури продуцента. Легку етанолову фазу скидають через отвір і верхню

кришку поршня насосом герметичноюю шланговою системою в збирач.

Промивання екстракту водою здійснюється у ємності з механічною мішалкою, куди дозатором подається питна вода в об'ємі, рівному об'єму культуральної рідини, перемішують із частотою $3,33 \text{ с}^{-1}$ 30 хв $t=25^\circ\text{C}$.

Для *упарювання та видалення розчинників, кристалізація продукту* застосовують вакуум випарювання при $t=85^\circ\text{C}$ у вакуум-випарному апараті, досягаючи концентрації сухих речовин у 65%.

Промивання етилацетатом для осадження каротину здійснюють у збірнику, куди через дозатор надходить розчин етилацетату, в якому не розчиняється каротин і утворюється чистіший кристалізований осад.

Висушування екстракту проходить у розпилювальній сушарці для випаровування термічно нестійких, в'язких та пастоподібних розчинів. У середині циліндричного корпусу пристрою отримують різку пару, на валу обертається диск, розпилюючи розчин дрібними краплями. Розчин надходить зверху, висихає на гарячому повітрі, відцентровою силою його кидають на стінку пристрою, фіксують. Порошок поступово сушать за $t=85^\circ\text{C}$ і $H=0,03$ МПа, на стінці пристрою лишається тонкий шар порошкоподібного каротину, який осипається та видалається через секторний затвор у збірник.

Фасування готового продукту у флакони відбувається на автоматичній лінії за допомогою пакувальної машини. Порошок каротину фасують у попередньо підготовані темні скляні флакони об'ємом 1 кг за допомогою шнекового дозатора для великих доз, флакони закривають підготованими гумовими пробками згідно з ТУУ 6.00152253-13, обертають темним папером. Допустима похибка не перевищує $\pm 3\%$. На флакони на автоматичній лінії наносять етикетки з паперу етикетного чи письмового, виготовлені поліграфічно чи тисненням із зазначенням необхідної для зберігання, подальшої реалізації та транспортування інформації.

Пакування, маркування, відвантаження готового продукту. Флакони з препаратом пакують у вторинну тару по 10 флаконів у партії. На коробку наносять чи вкладають всередину етикетку з інформацією щодо продукту.

Знешкодження відходів та промислових викидів. Відходи виробництва проходять стадії знезараження (знезараження вентиляційного та стерильного повітря, конденсату, некондиційного посівного матеріалу та культуральної рідини, промислових стоків, партій бракованого препарату тощо).

Для очищення повітря із живими клітинами мікроорганізмів, крапель культуральної рідини з продуктами метаболізму використовують сепаратор для відділення крапель і піни з подальшою очисткою від клітин у скрубєрі та повторно використовують як вентиляційне чи технологічне повітря.

Некондиційний посівний матеріал із посівного апарату, некондиційну культуральну рідину із ферментера піддають термічній обробці “гострою” парою при $P=0,3\text{МПа}$, $t=130-132^\circ\text{C}$, 40-5 хв., охолоджують подачею холодної технічної води в сорочку до $25-30^\circ\text{C}$, розбавляють водою до окиснення 450-700 мг/л, доводять рН до 7,0 HCl чи NaOH та зливають у загальнозаводську каналізаційну систему. Промивні дезінфікуючі розчини, залишки розчинів миючих засобів після санітарної обробки та відпрацьовану воду направляють до збірника нейтралізації стічних вод, де розводять водою в 3-4 рази, встановлюють рН на рівні 7,0 розчинами HCl чи NaOH , зливають у загальнозаводську каналізаційну систему.

Тверді відходи виробництва (склобой, рукавички, пакувальні матеріали, браковані флакони, пробки та ковпачки) утилізують на міському сміттєзвалищі.

Відновлення відходів. У даному виробництві використовують матеріали та речовини (фільтрувальні матеріали, органічні розчинники), що можуть використовуватись повторно за належної обробки. Відновлення тканинного фільтра для підготовки води та повітря здійснюють замоченням у гарячій воді, далі його очищають та обробляють дезінфікуючим розчином.

Пари та розчини різних етапів екстрагування, центрифугування та випаровування містять органічні розчинники (етилацетат, лимонна кислота, етанол). Використану пару попередньо конденсують, подають у регенератор із використовуваним розчином, переганяють до 95% об'єму. Чистий розчинник витікає до збору розчинника для повторного використання.

3.4. Обґрунтування вибраної конструкції ферментеру

Ферментер має задовольняти основні потреби процесу культивування клітин: підведення до кожної клітини достатньої кількості поживних речовин, відведення продуктів метаболізму, термостатування мікробіальної суспензії до кожної точки ферментаційного середовища, забезпечення підтримки оптимуму робочих параметрів кожної точки робочого об'єму, забезпечення необхідного рівня перемішування, аерації, високого рівня автоматизації культивування, техніки безпеки та умов праці.

Розрізняють механічні, ерліфтні і газо-вихрові біореактори, аеробні (з подачею повітря чи газових сумішей з киснем), анаеробні (без подачі кисню) і комбіновані (аеробно-анаеробні). У роботі обрано ферментер для глибинного аеробного культивування, за якого постійно забезпечують надходження у середовище кисню. Залежно від цього відрізняються і конструкції ферментерів: газорідні ферментери поділяють на ферментери з механічним диспергуванням газу, ерліфтні та струменеві.

За повного змішування зростання культур відбувається в реакторі-ферментері за інтенсивного перемішування культурального середовища мішалками (турбулентний режим), у будь-якій точці ферментера параметри мають бути однаковими, зміни параметрів відбуваються тільки в часі.

Найпоширенішим є ферментер з механічною мішалкою та підводом повітря через барботер, з рубашкою чи змієвиком для підводу/ відводу тепла. Конструкції ферментерів та інокуляторів мають бути герметичними для уникнення надходження інфекцій у культуральне середовище, сальник робочого валу апарату, прокладки люків та фланцевих з'єднань – щільними, надлишковий тиск має становити 0,15-0,25 кг/см². Апарат виготовляють із нержавіючої чи двошарової сталі.

Сучасні багатотоннажні біотехнологічні підприємства використовують ферментери змішування вертикального типу з одноваловим багатоярусним перемішувачем, зокрема ферментер Ф-6,3-1К-01 для асептичного культивування. Прилад оснащений системою миття та стерилізації

насиченою водяною парою, герметизація місця введення валу – торцевим ущільненням з термічним затвором. Підведення стерильного повітря – через барботер, регуляція температури культивування – багатосекційною зовнішньою сорочкою та чотирма вбудованими спіральними теплообмінниками. Потужність привода механічного перемішуючого пристрою зі швидкістю обертання $3,27\text{с}^{-1}$ 90 кВт.

Розповсюдження є перемішування із введенням у змішувальне середовище механічної енергії із зовнішнього джерела (за допомоги змішувачів обертового руху від електродвигуна, через редуктор чи клиноремінну передачу). Механічні перемішуючі пристрої складаються з власне мішалки, валу і приводу. Мішалка – робочий елемент приладу, закріплений на горизонтальному, вертикальному чи нахиленому валу.

По влаштуванню лопатей вирізняють змішувачі лопатеві, пропелерні, турбінні, якірні, рамні тощо (рис. 8) [35]. За високих швидкостей обертання мішалок перемішувана рідина втягується в круговий рух, навколо валу утворюється воронка, глибина якої зростає зі зростанням числа обертів, зменшення густини і в'язкості середовища. Для запобігання її утворення в апараті розміщують відбивні перегородки.

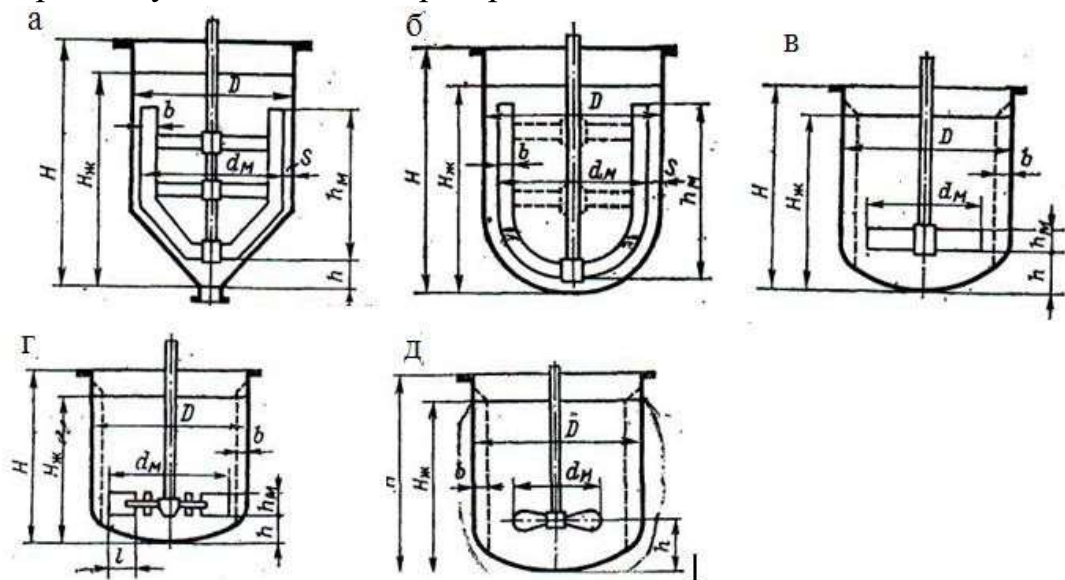


Рис 8. Типи мішалок: а) лопатна; б) якірна; в) рамна; г) турбінна; д) пропелерна

Для забезпечення інтенсивнішого перемішування в горизонтальній і вертикальній площинах використовують турбінні мішалки (швидкохідні, з

формою колеса водяних турбін з плоскими, нахиленими чи криволінійними лопатками, закріпленими на вертикальному валу). Апарати з турбінними мішалками застосовують радіальні потоки рідини.

Турбінні мішалки є відкриті та закриті. Перші є вдосконаленою конструкцією простих лопатевих мішалок, обертання лопатей, розташованих під кутом до вертикальної площини, створює і радіальні, і осьові потоки рідини, сприяючи інтенсивному перемішуванню великих обсягів, особливо за наявності відбивних перегородок [41]. Закриті мішалки містять два диски з отворами для проходження рідини; диски зверху та знизу приварюються до плоских лопатей. Радіальні потоки рідини досить швидкі, досягають найвіддаленіших точок апарату. Рідина надходить до змішувача паралельно осі валу, у колесі змішувача її напрямком змінюється від вертикального (по осі) до горизонтального (по радіусу) та викидається з колеса з великою швидкістю, тож досягається швидке та ефективне перемішування.

Перспективним є застосування турбінних мішалок з лопатями або колесами, розташованих на різній висоті для інтенсивного перемішування у всьому об'ємі. За великого відношення висоти до діаметра апарату застосовують багаторядні турбінні змішувачі. Потужність змішувачів у апаратах з відбійними перегородками практично не залежить від в'язкості середовища, тому їх використовують для сумішей зі змінною в'язкістю.

Для перемішування в великих об'ємах (2500 м^3 і більше) пропелерні змішувачі чи сопла є ефективнішими за турбінні змішувачі. Турбінні мішалки мають діаметр $d=(0,15-0,65) D$ при відношенні висоти рівня рідини до діаметра – не більше 2. При більших значеннях застосовують багаторядні змішувачі. Число обертів – 2-5 в секунду, окружна швидкість 3-8 м/с [41].

Перевагами турбінних мішалок є швидкість перемішування і розчинення, ефективне перемішування в'язких рідин, придатність для безперервних процесів, недоліками – порівняльна складність, висока вартість виготовлення, малопридатність для перемішування великих об'ємів. Турбінні мішалки застосовують для інтенсивного перемішування і змішування рідин, в'язкість

яких змінюється у широких межах; тонкого диспергування і швидкого розчинення; скаламучування осадів у рідинах із понад 60% твердої фази (для відкритих мішалок до 60%) із допустимими розмірами часточок до 1,5 мм для відкритих мішалок та до 25 мм – для закритих.

Технічна характеристика ферментеру

Апарат, призначений для біосинтезу β -каротину з культуральної рідини *Blakeslea trispora* K2 має номінальний об'єм 6,3 м³, містить одну відкриту турбінну мішалку без відбивних перегородок. Частота обертання вала мішалки – 3,33с⁻¹, потужність електродвигуна – 2,2 кВт. Довжина апарату – 2710 мм, ширина – 2710 мм, висота – 2780 мм, маса – 5200 кг

3.5. Вибір загальнозаводського обладнання

Окремі етапи технологічного процесу потребують перекачування рідин, поживного середовища та посівного матеріалу по трубопроводам, за яких відбувається подача шкідливих та вибухонебезпечних речовин. Для цього використовують насоси, що унеможливають викиди речовин у довкілля, зокрема центробіжний герметичний електронасос типу ХГВ та ЦНГ у вибухозахищеному виконанні. У них відсутні сальникові та торцеві укріплення, тож не допускається інфікування довкілля, їх підшипники змазуються перекачуванню рідиною, тому не забруднюються змазкою.

Вентилятори систем промислової вентиляції, пневмотранспортних та інших установок за принципом дії поділяють на центробіжні та осьові. При виборі виду вентилятора виходять із заданих величин тиску, продуктивності, концентрації механічних домішок, температури газів. Для дільниці біосинтезу було обрано приливний та витяжний вентилятори типу В-Ц14-46-5К-02 з двигуном АО2-71-4 із продуктивністю 5,55 м³/с.

Підприємства мікробіологічної промисловості використовують 80-90% води на охолодження технологічного обладнання. Для охолодження апаратури проектується систему зворотного водопостачання. Охолодження відпрацьованої, теплої, умовно чистої води відбувається за рахунок часткового випарювання за контакту зі струмом повітря.

4. ЕКОНОМІЧНА ЕФЕКТИВНІСТЬ

Основою виробництва є морквяні вичавки, ціна приблизно 7 грн/кг. Морквяних вичавок використовується 100т.

Пропанол продається ~ за 45 грн/кг, його використовується 300 т. Ціна етанолу складає приблизно 135 грн/л. Етанолу використовується приблизно 4 т, приблизно 3,2 м³.

Ціна дихлоретану приблизно 180 грн/кг. Дихлоретану використовується приблизно 7 т.

Ціна їдкого калі приблизно 120 грн/кг. Їдкого калі використовується приблизно 900 кг.

Таблиця 2. Витрати на сировину на добу

Назва	Кількість, кг	Витрати на сировину, грн	Витрати на транспортування сировини, грн.
Морквяні вичавки	100 000	700 000	-
Пропанол	300 000	13 500 000	675 000
Етанол	9000	1 215 000	37 800
Дихлоретан	12000	2 160 000	67 500
Їдкий калі	900	108 000	5 400

З метою зменшення витрат на виробництво пропонується проводити регенерацію розчинників. З врахуванням відновлення та повернення на виробництво пропанолу, дихлоретану та етанолу їх ціни складають відповідно 5000000 грн, 800000 грн та 450000 грн.

Загальні витрати на сировину за добу з врахуванням відновлення розчинників складає 7375900 грн. Витрати за рік – 2692203500 грн.

Таблиця 3. Витрати на апарати

Назва апарату	К-сть	Ціна за 1 шт.	Витрати на встановлення, налаштування, транспортування	Витрати електроенергії, кВт/добу	Загальна сума
Екстрактор вертикальний шнековий	1	560000	280000	310	840000
Випарний трубчастий плівковий апарат	2	615000	307500	252	1845000
Реактор з якірною мішалкою об'ємом 2 м ³	2	1100000	550000	144	2300000
Вакуум-випарний апарат	1	1300000	650000	52,8	1950000

Реактор з якірною мішалкою об'ємом 1 м ³	1	380000	190000	13,2	570000
Нутч-фільтр	2	52000	26000	72	156000
Багатоступінчастий вакуум-кристалізатор	2	2200000	1100000	156	6600000
Сепараційний модуль	2	380000	190000	259,2	1140000
Сублімаційна сушарка	1	55000	27500	8,5	82500
Відцентровий насос	9	3000	1500	324	40500

Загальна вартість обладнання – 15524000 грн. Загальні витрати електроенергії на виробництві за добу – 1591,7 кВт. Ціна за 1 кВт електроенергії в 2022 році складає 1,68 грн. Загальні витрати на електроенергію за місяць – 80 222 грн. Загальні витрати на електроенергію за рік – 962 664 грн.

Загальні витрати на оплату праці

Кількість робітників на виробництві – 30 осіб. Робочий день – 8 годин. Кількість робочих днів в тижні – 5. Кількість робочих днів в місяці – 30. Середня заробітна плата в день – $80 \cdot 8 = 640$ грн.

Оплата праці в день на всіх робітників – $640 \cdot 30 = 19200$ грн. Оплата праці в місяць – $640 \cdot 20 = 12800$

Витрати на заробітні виплати працівникам в місяць – $12800 \cdot 30 = 384000$ грн.

Витрати на заробітні виплати працівникам в рік – $384000 \cdot 12 = 4608000$ грн

Рентабельність виробництва

Рентабельність виробництва розраховується із собівартості готового продукту. Собівартість готового продукту виробництва складається з наведених вище витрат на сировину, витрат на проведення технологічних процесів (електроенергія і обладнання), заробітної плати працівникам виробництва.

Таблиця 4. Загальні витрати на виробництво бета-каротину

Назва	Витрати, грн
Сировина	2 692 203 500
Обладнання	15 524 000
Електроенергія	962 664
Оплата праці	4 608 000
Всього	2 713 298 164

Собівартість 1 кг бета-каротину складає 354000 грн/кг.

На сьогодні середня ціна бета-каротину на ринку складає приблизно 400000 грн/ кг. Чистий прибуток підприємства за кожний 1 кг бета каротину складає 46000 грн.

Рентабельність підприємства складає:

$$P = \frac{966\,000}{7\,434\,000} * 100 = 12,99\%.$$

Виходячи з отриманих даних, можна зробити висновок, що підприємство є рентабельним.

ВИСНОВКИ ТА ПРОПОЗИЦІЇ

1. Для виробництва харчового стабілізаційно профілактичного продукту Вітаміну А як продуцент обрано *Blakeslea trispora* K2 із активністю біосинтезу 2000 мг/л культуральної рідини.
2. Проаналізовано методи селекції промислових штамів-продуцентів каротинів, запропоновано схему отримання продуценту шляхом тріступінчастої послідовної обробки мутагенами у встановлених ефективних дозах: тіосульфатом натрію (20 г/л), нітрозогуанідином (1 мг/мл) та твін-80 (1мл/л), впродовж 4 днів.
3. Згідно фізіолого-біохімічних особливостей *Blakeslea trispora* K2 обрано склад поживного середовища для виробничого біосинтезу на основі кукурузного екстракту, соєвого борошна, рослинної олії, визначено раціональні параметри культивування: $t=28\pm 1^{\circ}\text{C}$, за перемішування при 200 об/хв, тривалості 72 год, аерації $1 V_{\text{пов}}/V_{\text{ПС}}\cdot\text{хв}$.
4. Згідно визначених фізико-хімічних та біологічних параметрів продукту для біосинтезу обрано та розраховано конструкцію виробничого ферментеру для отримання препарату належної якості (концентрація β -каротину 2000 од/г, вміст сухої речовини 95%) із залишковою вологістю 5%.
5. У якості екстрагенту вітамінного препарату запропоновано використовувати етанол, що обумовлено швидкістю та якістю його вилучення та найвищою концентрацією продукту в культуральній рідині.
6. Наведено обґрунтування запропонованої технології отримання бета-каротину. Собівартість 1 кг β -каротину складає 354000 грн. Рентабельність виробництва – 13,0%.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Alvarez, R., Vaz, B., Gronemeyer, H., & de Lera, A. R. (2014). Functions, therapeutic applications, and synthesis of retinoids and carotenoids. *Chemical reviews*, 114(1), 1-125.
2. Amorim-Carrilho, K. T., Cepeda, A., Fente, C., & Regal, P. (2014). Review of methods for analysis of carotenoids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 56, 49-73.
3. Black H. The role of nutritional lipids and antioxidants in UV-induced skin cancer. *Frontiers in Bioscience*. 2015. Vol. 7(1). P. 30-39.
4. Bogacz-Radomska, L., & Harasym, J. (2018). β -Carotene—properties and production methods. *Food Quality and Safety*, 2(2), 69-74.
5. Canini, D., Martini, F., Cazzaniga, S., Miotti, T., Pacenza, B., D'Adamo, S., & Ballottari, M. (2024). Genetic engineering of *Nannochloropsis oceanica* to produce canthaxanthin and ketocarotenoids. *Microbial Cell Factories*, 23(1), 322.
6. Eroglu, A., & Harrison, E. H. (2013). Carotenoid metabolism in mammals, including man: formation, occurrence, and function of apocarotenoids: Thematic Review Series: Fat-Soluble Vitamins: Vitamin A. *Journal of lipid research*, 54(7), 1719-1730.
7. Igreja, W. S., Maia, F. D. A., Lopes, A. S., & Chisté, R. C. (2021). Biotechnological production of carotenoids using low cost-substrates is influenced by cultivation parameters: A review. *International journal of molecular sciences*, 22(16), 8819.
8. Igreja, W. S., Maia, F. D. A., Lopes, A. S., & Chisté, R. C. (2021). Biotechnological production of carotenoids using low cost-substrates is influenced by cultivation parameters: A review. *International journal of molecular sciences*, 22(16), 8819.
9. Kuzmak, I. P. (2022). АНТОЦΙΑНИ Й АНТОЦІАНІДИНИ ЯК КОМПОНЕНТИ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО ХАРЧУВАННЯ: БІОХІМІЯ ТА ВПЛИВ НА ЗДОРОВ'Я ЛЮДИНИ:(ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ). *Medical and Clinical Chemistry*, (4), 111-124.
10. Malik, K., Tokkas, J., & Goyal, S. (2012). Microbial pigments: a review. *Int J Microbial Res Technol*, 1(4), 361-365.
11. Nasrabadi, M. R. N., & Razavi, S. H. (2011). Optimization of β -carotene production by a mutant of the lactose-positive yeast *Rhodotorula acheniorum* from whey ultrafiltrate. *Food Science and Biotechnology*, 20, 445-454.
12. Nigam, P. S., & Luke, J. S. (2016). Food additives: production of microbial pigments and their antioxidant properties. *Current Opinion in Food Science*, 7, 93-100.
13. Pourkarimi, S., Hallajisani, A., Alizadehdakhel, A., Nouralishahi, A., & Golzary, A. (2020). Factors affecting production of beta-carotene from *Dunaliella salina* microalgae. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29, 101771.
14. Ribeiro, B. D., Barreto, D. W., & Coelho, M. A. Z. (2011). Technological aspects of β -carotene production. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 693-701.
15. Tupys, A. M., Tymoshuk, O. S., & Rydchuk, P. V. (2015). The Application of 1-(5-Benzylthiazol-2-yl) azonaphthalen-2-ol in Extraction-Photometric Analysis

- of the Main Soils Pollutants Content (Copper, Zinc, Cadmium and Lead). *Methods*, 10(2), 80-88.
16. Xavier, A. A. O., & Pérez-Gálvez, A. (2016). Carotenoids as a Source of Antioxidants in the Diet. *Carotenoids in Nature: Biosynthesis, Regulation and Function*, 359-375.
17. Аксьонов, С. К. (2019). Дослідження нових видів пакувальних матеріалів.
18. Велигодська А. К., Федотов О. В. Отримання та аналіз препаратів каротиноїдів деяких штамів ксилотрофних базидоміцетів *Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія*. 2016. № 24(2). С. 290-294.
19. Гончаренко, Г. Є. (2015). Суб'єктивні ознаки порушення правил поведження з екологічно небезпечними речовинами і відходами.
20. Гураль, С. В. ВПЛИВ ГЛЦЕРОЛУ НА РІСТ ТА КАРОТИНОГЕНЕЗ ДРІЖДЖІВ *RHAFRIA RHODOZYMA* (*XANTHOPHYLLOMYCES DENDRORHOUS*).
21. Гураль, С., Камінська, М., & Стефанишин, О. (2014). ІНДУКЦІЯ БІОСИНТЕЗУ КАРОТИНОЇДІВ У КЛІТИНАХ ДРІЖДЖІВ *RHAFRIA RHODOZYMA* ЗА ДІЇ ІОНІВ Cu^{2+} , Cd 2. *ББК 65.9 (4Укр)-55 Н 34*, 68.
22. Дейнеко, Л. В., Шелудько, Е. І., Купчак, П. М., & Романюк, І. М. (2013). Харчова промисловість України: ефективність використання виробничих ресурсів і кадрового потенціалу. ДУ" Інститут економіки та прогнозування НАН України".
23. Зубарева, І. М., Семененко, І. В., & Мітіна, Н. Б. (2023). Удосконалення способу визначення бета-каротину в міцеліальній біомасі.
24. Іванова В. Д., Сімахіна Г. О. Технологія природних вітамінів: навч. посіб. Київ : НУХТ, 2015. 343с
25. Капрельянц, Л. В., & Негру, І. Ф. (2012). 100074 Спосіб одержання водорозчинної форми лікопіну у формі комплексу включення з β -циклодекстрином.
26. Кравчук М. В., Белих І. А. Біотехнологічне виробництво β -каротину з використанням мукорового грибу *Blakeslea trispora*. *Вісник НТУ "ХПІ"*. 2015. № 45(1148). С. 56-61.
27. Курінний, Д. А. (2016). Модифікація астаксантином радіаційно-індукованої хромосомної нестабільності в соматичних клітинах людини *in vitro*. *Faktori eksperimental'noi evolucii organizmiv*, 18, 236-238.
28. Манушкіна Т. М. Біотехнологія в рослинництві : курс лекцій / Т. М. Манушкіна. – Миколаїв : МНАУ, 2014. – 51 с.
29. Мацкевич В. В. Фізіологія та біотехнологія рослин : підручник / В. В. Мацкевич, Л. М. Філіпова, О. Г. Олешко. Біла Церква : БНАУ, 2022. 427 с.
30. Мелешко, В. І., Самошкін, В. В., & Малютова, О. М. (2019). Екзогенні антиоксиданти в спортивній практиці. *ББК 75.03 А 38*, 135.
31. Мельничук, Г. М., & Личковська, О. Л. (2015). Альтернативні немедикаментозні методи протимікробного лікування хворих із патологією пародонта: озонотерапія, фотодинамотерапія; механізм дії, показання та протипоказання до використання. *Клінічна стоматологія*, (1), 28-37.

32. Пирог, Т. П. Становлення та розвиток біотехнології / Т. П. Пирог, О. А. Ігнатова // Загальна біотехнологія : підручник. - Київ : НУХТ, 2009. - С. 9-16.
33. Пирог, Т. П., Клименко, Н. О., Шевчук, Т. А., & Іутинська, Г. О. (2019). Інтегровані технології мікробного синтезу кількох цільових продуктів.
34. Прісс, О. П., & Загорко, Н. П. (2016). Вплив теплової обробки біологічно активними речовинами на функціонування системи низькомолекулярних антиоксидантів під час зберігання плодів перцю. *Вісник Національного технічного університету Харківський політехнічний інститут. Серія: Нові рішення в сучасних технологіях*, (12), 169-175.
35. Севостьянов, І. В., & Зозуляк, І. А. (2020). Технологічне обладнання цехів переробки продукції тваринництва. *навч. посіб.-Вінниця: ВНАУ, 2020.-127 с.*
36. Семенов, А. О., Сахно, Т. В., & Кожушко, Г. М. (2017). Аналіз ролі УФ-випромінювання на розвиток і продуктивність різних культур. *Світлотехніка та електроенергетика*, (2), 3-16.
37. Сидорова, М. В. (2011). ОксиЛік та Цинкіт–універсальні антиоксиданти для лікування вікової макулярної дегенерації. *Ліки України*, (5), 76-81.
38. Сімахіна, Г. О. (2010). Функціональна роль каротиноїдів та особливості їх використання у харчових технологіях.
39. Сімонова, М. (2010). Каротиноїди: будова, властивості та біологічна дія. *Біологічні студії*, 4(2), 159-170.
40. Чудан, А. В. (2024). Біосинтез β-каротину *Blakesleea trispora*.
41. Шабрацький, С. В. (2017). *Гідродинаміка газорідинних систем в реакторах з самоусмоктуючими перемішуючими пристроями* (Doctoral dissertation, Сумський державний університет).
42. Шевченко, Л. В., Михальська, В. М., Яремчук, О. С., & Варпіховський, Р. Л. (2018). Механізми засвоєння каротиноїдів у тварин (огляд). *Web of Scholar*, 4(6), 43-51.
43. Шевченко, Л. В., Михальська, В. М., Яремчук, О. С., Камінська, О. В., & Байер, О. В. (2018). Джерела каротиноїдів та їх характеристика (огляд). *Science Review.-Warsaw, Poland, 2018.-№ 8 (15).-P. 19-26*
44. Якімова, О. В., & Білявська, Н. О. (2010). Біохімічні та молекулярні аспекти фотопродукування водню.
45. Якубчак, О. М. (2023). ВПЛИВ БАРВНИКІВ ЖОВТКІВ НА ЯКІСТЬ І БЕЗПЕЧНІСТЬ КУРЯЧИХ ЯЄЦЬ ЗА РІЗНИХ РЕЖИМІВ ЗБЕРІГАННЯ.