

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**СУМСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**  
**Факультет агротехнологій та природокористування**  
**Кафедра біотехнології та хімії**

До захисту допускається

Завідувач кафедри

\_\_\_\_\_  
Владислав КОВАЛЕНКО

" \_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

за першим (бакалаврським) рівнем вищої освіти

на тему: «Одержання  $\beta$ -каротину *Escherichia coli*»

Виконав (-ла):

Сергій ВЛАСЕНКО

\_\_\_\_\_  
*Ім'я ПРИЗВИЩЕ*

Група:

БЮ 2101

Науковий керівник

Ольга ДУБОВИК

\_\_\_\_\_  
*Ім'я ПРИЗВИЩЕ*

Рецензент

Юрій МІЩЕНКО

\_\_\_\_\_  
*Ім'я ПРИЗВИЩЕ*

СУМИ -2025

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
СУМСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**Факультет *агротехнологій та природокористування***

**Кафедра *біотехнології та хімії***

**Ступень вищої освіти – *бакалавр***

**Спеціальність – *162 «біотехнології та біоінженерія»***

**ЗАТВЕРДЖУЮ:**

**Завідувач кафедри**

\_\_\_\_\_  
**Владислав КОВАЛЕНКО**

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 202\_ р.

**ЗАВДАННЯ  
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ  
Власенку Сергію Миколайовичу**

Тема роботи: **Одержання  $\beta$ -каротину *Escherichia coli***

1. Керівник бакалаврської роботи **Дубовик Ольга Олексіївна, к. с.-г. н., доцент**

2. Строк подання здобувачем закінченої роботи \_\_\_\_\_

3. Вихідні дані до кваліфікаційної роботи – \_\_\_\_\_

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які необхідно опрацювати) \_\_\_\_\_

5. Перелік графічного матеріалу (з точною вказівкою обов'язкових креслень) \_\_\_\_\_

Керівник кваліфікаційної роботи \_\_\_\_\_ / **Ольга ДУБОВИК**  
*підпис* *Ім'я, ПРИЗВИЩЕ*

Завдання прийняв до виконання \_\_\_\_\_ / **Сергій ВЛАСЕНКО**  
*підпис* *Ім'я, ПРИЗВИЩЕ*

Дата отримання завдання « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20\_ р.

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ п/п	Назви етапів кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітки
1.	Вибір теми і об'єкта досліджень	5-й семестр	
2.	Розробка завдання до кваліфікаційної роботи; складання календарного плану; формування змісту розрахунково-пояснювальної записки (формування переліку питань, які необхідно опрацювати в роботі). Підбір методик для проведення досліджень	5-й семестр	
3.	Виконання кваліфікаційної роботи	8-й семестр	
3.1.	Підбір та аналіз літературних джерел з теми кваліфікаційної роботи	5-й семестр	
3.2.	Збір вихідних даних (проведення польових досліджень) для написання експериментальної частини кваліфікаційної роботи	6-й семестр	
3.3.	Підготовка загального варіанту кваліфікаційної роботи (розділ 1-3, висновки)	7-й семестр	
3.4.	Апробація результатів дослідження	За 40 днів до дати захисту	
4.	Перевірка роботи науковим керівником і допуск до попереднього захисту	За 35 днів до дати захисту	
5.	Перевірка кваліфікаційної роботи на унікальність	За 30 днів до захисту	
6.	Рецензування	За 15 днів до захисту	
7.	Попередній захист кваліфікаційної роботи	За 10 днів до захисту	
8.	Прилюдний захист кваліфікаційної роботи перед екзаменаційною комісією	Відповідно наказу ректора	

Керівник кваліфікаційної роботи \_\_\_\_\_ / Ольга ДУБОВИК  
*підпис* *Ім'я, ПРІЗВИЩЕ*

Здобувач \_\_\_\_\_ / Сергій ВЛАСЕНКО  
*підпис* *Ім'я, ПРІЗВИЩЕ*

## АНОТАЦІЯ

Власенко Сергій Миколайович

### ОДЕРЖАННЯ $\beta$ -КАРОТИНУ *ESCHERICHIA COLI*

162 Біотехнології та біоінженерія

### СУМСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Суми – 2025

Кваліфікаційна робота присвячена розробці біотехнологічного виробництва  $\beta$ -каротину культивуванням штаму бактерій *Escherichia coli* YJM49 з кількістю синтезованого цільового продукту 3,2 г/л.

$\beta$ -каротин є джерелом вітаміну А, що володіє антиоксидантними є ефективним засобом комбінованого захисту організму від впливу радіації, а для профілактики при серцево-судинних і онкологічних захворювань. Розраховано річну потужність виробництва  $\beta$ -каротину, яка становить 255 кг. Технологічний процес складається з допоміжних (підготовка аераційного повітря, приготування та стерилізація розчину мікроелементів, зберігання гліцерину, приготування титрувальних агентів та підготовка і стерилізація поживних середовищ) та основних робіт (виращування інокуляту в колбах на качалці та посівних апаратах об'ємами 5 л, 60 л, 0,63 м<sup>3</sup>, а також виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 6,3 м<sup>3</sup>).

Кваліфікаційна робота викладена на 44 сторінках друкованого тексту, містить 8 таблиць, 11 рисунків і складається зі вступу, 3 розділів та списку використаної літератури (39 джерел).

**Ключові слова:** *Escherichia coli* YJM49,  $\beta$ -каротину, харчовий барвник, *Escherichia*, біосинтез.

## **ABSTRACT**

**Vlasenko Serhiy Mykolayovych**

### **OBTECTION OF $\beta$ -CAROTINE FROM ESCHERICHIA COLI**

**162 Biotechnology and bioengineering**

**SUMY NATIONAL AGRARIAN UNIVERSITY**

**Sumy - 2025**

The qualification work is devoted to the development of biotechnological production of  $\beta$ -carotene by cultivating the Escherichia coli YJM49 bacterial strain with an amount of synthesized target product of 3.2 g/l.

$\beta$ -carotene is a source of vitamin A, which has antioxidant properties and is an effective means of combined protection of the body from radiation exposure, and for the prevention of cardiovascular and oncological diseases. The annual production capacity of  $\beta$ -carotene is calculated, which is 255 kg. The technological process consists of auxiliary (preparation of aeration air, preparation and sterilization of a solution of trace elements, storage of glycerin, preparation of titration agents and preparation and sterilization of nutrient media) and main works (cultivation of inoculum in flasks on a rocking chair and inoculating devices with volumes of 5 l, 60 l, 0.63 m<sup>3</sup>, as well as production biosynthesis in a fermenter with a volume of 6.3 m<sup>3</sup>).

The qualification work is presented on 44 pages of printed text, contains 8 tables, 11 figures and consists of an introduction, 3 chapters and a list of references (39 sources).

**Keywords:** Escherichia coli YJM49,  $\beta$ -carotene, food coloring, biosynthesis.

## ЗМІСТ

	стор
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ВЛАСТИВОСТІ ТА ЗНАЧЕННЯ КАРАТИНОЇДІВ	8
1.1. Характеристика цільового продукту	8
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА АГЕНТА	14
2.1. Обґрунтування підбору агента та середовища для культивування	14
2.2. Таксономічний статус агента	22
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	24
3.1. Визначення потреб виробництва продукту	24
3.2. Вибір схеми технологічної	29
3.3. Специфікація обладнання	37
3.4. Контроль виробництва	39
ВИСНОКИ ТА ПРОПОЗИЦІЇ	43
ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА	44
ДОДАТКИ	49

## ВСТУП

Мікробіологія на сьогодні є однією з найважливіших біологічних наук. Адже, без розуміння характеристик мікроорганізмів і методів їхнього виживання, неможливо досягнути багатогранності проявів життя на планеті, умов його становлення та змін, будови біосфери та її функцій, процесів обміну речовин і енергії. Розвиток біотехнологій дозволяє значно прискорювати виробництво, збільшувати результативність використання природних ресурсів, розв'язувати екологічні питання, знаходити альтернативні джерела енергії [1].

Каротиноїди - це барвники жовтого, оранжевого або червоного кольору, що їх синтезують вищі рослини, гриби та бактерії. Вони виконують важливу функцію в біохімічних процесах живих організмів. Організми людини та тварин не можуть їх синтезувати самостійно, тому потребують регулярного надходження цих сполук з їжею, адже каротиноїди забезпечують ряд життєво необхідних функцій. Найбільш відомі каротиноїдні пігменти як провітамін А, котрий належить до групи жиророзчинних вітамінів і є похідною тетратерпенового ряду (C<sub>40</sub>H<sub>64</sub>). В харчовій промисловості бета-каротин набув широкого використання завдяки своїм фізіологічним і технологічним властивостям [2, 3, 4, 5].

На теперішній час, єдиним економічно вигідним способом промислового виробництва β-каротину є мікробіологічний метод, який базується на сумісному культивуванні двох статевих форм міцеліального гриба *Blakeslea trispora*. Біомаса продуцента використовується як вихідний матеріал для виробництва та випуску широкого спектру каротиновмісних продуктів, потреба в яких, завдяки антиоксидантним та радіопротекторним властивостям β-каротину, щороку збільшується в багатьох країнах світу в різних секторах економіки. [6].

Дослідження, показали, що крім ролі в забезпеченні зору (фоторецепція - пігмент родопсин світлочутливий, розташований на зовнішній частині паличок на сітківці, відповідає за зір у сутінках), вітамін А і похідні є важливими для правильного розвитку ембріонів, перебігу процесів репродукції, імунної

системи і тд [7].

Завдання інтенсифікації промислового видобутку каротиновмісної біомаси та продуктів на основі цієї маси зберігає свою актуальність. Від вирішення залежить безпосередньо стратегія технологічного розвитку в подальшому, а також стан відповідних галузей, котрі використовують цю продукцію, стан ринку споживання та загальний економічний та матеріально-технічний стан виробництва, зокрема перспективи його майбутнього. Одним із підходів до розв'язання поставленої задачі є вдосконалення вже існуючих технологічних режимів, а також розробка нових, що застосовуються на ключових етапах виробництва. Це дасть змогу інтенсифікувати процеси, підвищити якість кінцевої продукції, покращити техніко-економічні результати.

Мета роботи – дослідити можливості використання *Escherichia coli* для отримання  $\beta$ -каротину.

Завдання: обґрунтувати вибір біологічного агенту, поживного середовища для його культивування, визначити потребу у цільовому продукті, розрахувати потужності виробництва, кількості стадій та виробничих циклів.

Об'єкт дослідження - штам YJM49 *Escherichia coli*, предмет – технологічна схема отримання  $\beta$ -каротину.

Методи - хімічного синтезу, глибинного культивування, біотехнологічного контролю.

Новизна представленої кваліфікаційної роботи полягає у масштабуванні до промислових масштабів процесу біосинтезу  $\beta$ -каротину із застосуванням штаму YJM49 *Escherichia coli*. Цей штам демонструє здатність нарощувати біомасу із значною концентрацією (3,2 г/л  $\beta$ -каротину), при цьому використовуючи доступне та недороге поживне середовище..

Кваліфікаційна робота викладена на 44 сторінках друкованого тексту, містить 8 таблиць, 11 рисунків і складається зі вступу, 3 розділів та списку використаної літератури (39 джерел).

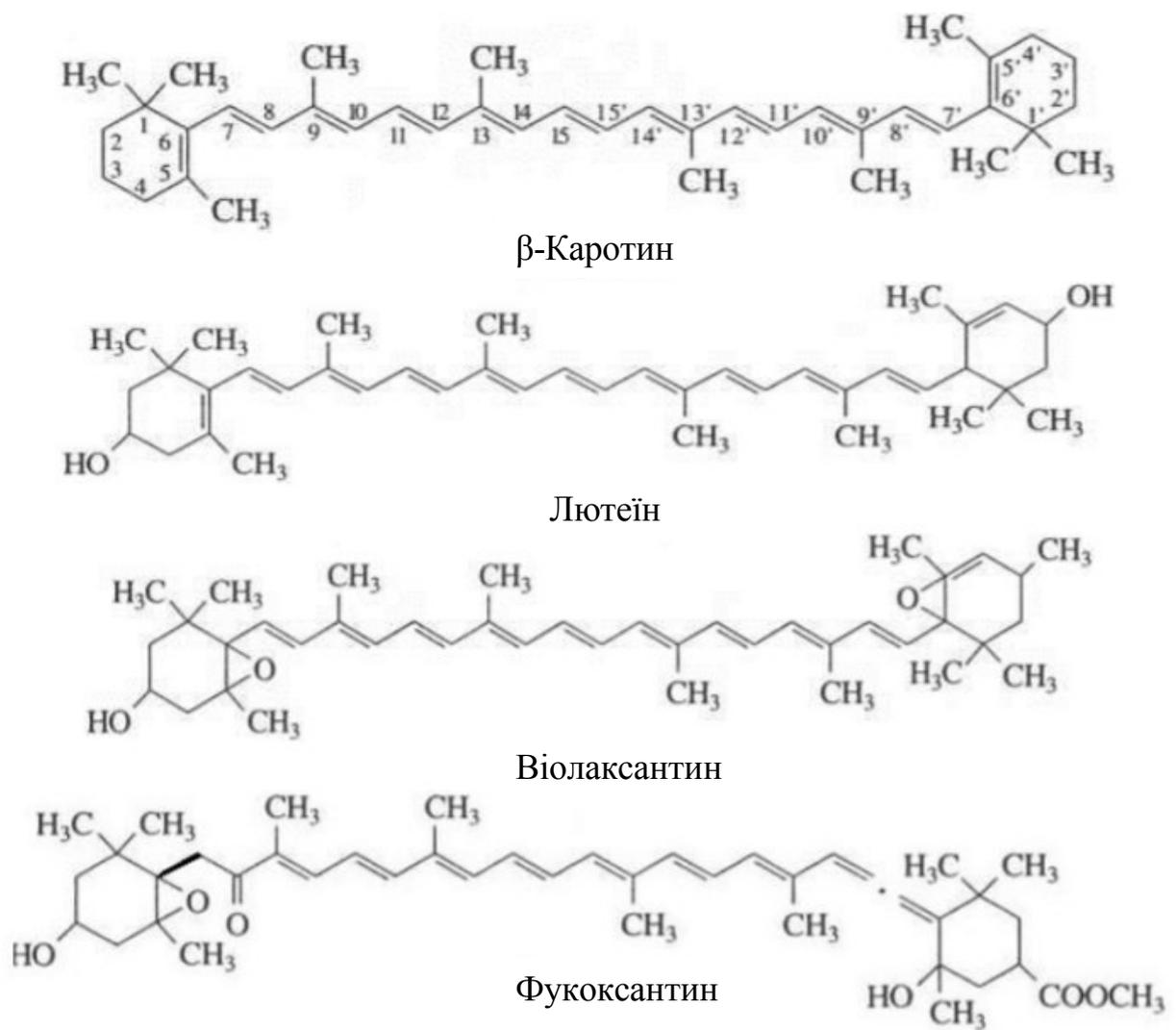
## РОЗДІЛ 1 ВЛАСТИВОСТІ ТА ЗНАЧЕННЯ КАРАТИНОЇДІВ

Каротиноїди (від латинського *Carota* – морква і від грецького *Eidos* – вигляд) – пігменти жовтогарячого забарвлення, що їх виробляють вищі рослини, а також гриби, бактерії та водорості. Саме каротиноїди зумовлюють червоний, жовтий та пурпуровий кольори плодів та квітів. Це поліненасичені сполуки терпенового ряду, їх структура передбачає 40 атомів Карбону у молекулі.

Каротиноїди – найпоширеніший клас біологічних пігментів у природі. Їх знайдено в більшості живих організмів, зокрема, у всіх рослинах та у великій кількості мікроорганізмів, причому нараховують понад 600 різновидів [8, 9]. Каротиноїди, які відповідають за забарвлення багатьох комах, тварин, риб та птахів. Каротиноїди в клітинах рослин захищають від світла, виконуючи роль антиоксидантів, котрі нейтралізують вільні радикали, що утворюються під час фотосинтезу. Цей пігмент є у хлоропластах клітини та інших організмів. Каротиноїди та похідні – ключові компоненти пігментів для зору, які забезпечують сприйняття світла та кольору тваринами.

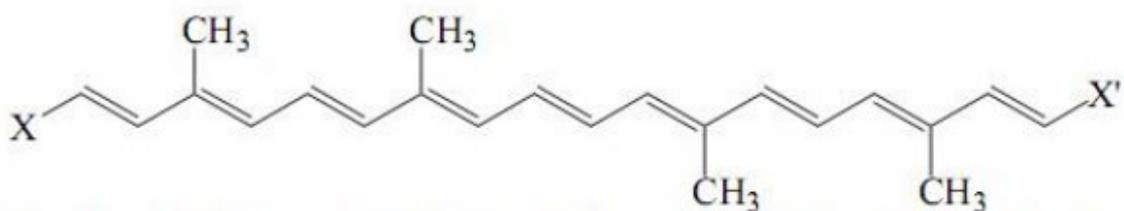
Найбільшого поширення серед каротиноїдів зазнали альфа-, бета-, гамма-каротини. Ці ізомери розрізняються проявом біологічної активності та будовою циклогексанових кілець. Каротини не можуть взаємодіяти з водою, але вільно розчиняються в органічних розчинниках, таких як бензол, хлороформ, етер, жири та олії. Ці сполуки руйнуються світлом, чутливі до окиснення киснем, нестійкі в присутності кислот та лугів, при нагріванні [10].

Праці славетних радянських біохіміків засвідчили, що каротиноїди наявні в бурих водоростях, котрі вирізняються світлостійкістю, зберігають стабільність в кисневому середовищі, розчинні в спиртових розчинах. Ксантофіл – молекула, у структурі якої містяться атоми кисню. Фукоксантин, виділений з роду *Cystoseira* бурих водоростей. На рисунку 1.1 є структурні формули.



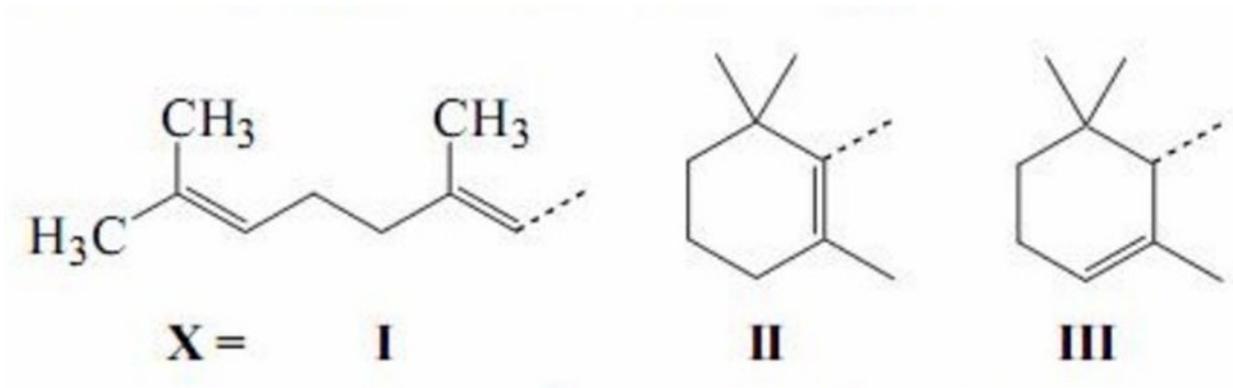
**Рис. 1.1. Формули каротиноїдів**

Значна кількість каротиноїдів зумовлена відмінностями в будові X та X' фрагментів. Проте, слід брати до уваги лише кілька геометричних цис-транс ізомерів, характерних для кожного конкретного каротиноїду [10].



**Рис. 1.2. Структурні фрагменти, X та X'**

Кількість структур X може бути значна, проте не всі значущі однаково для людини. Найпростішим можна вважати замінник ациклічної «лінійної» будови(I)[10].



**Рис.1.3. Можливі структури фрагментів каротиноїдів**

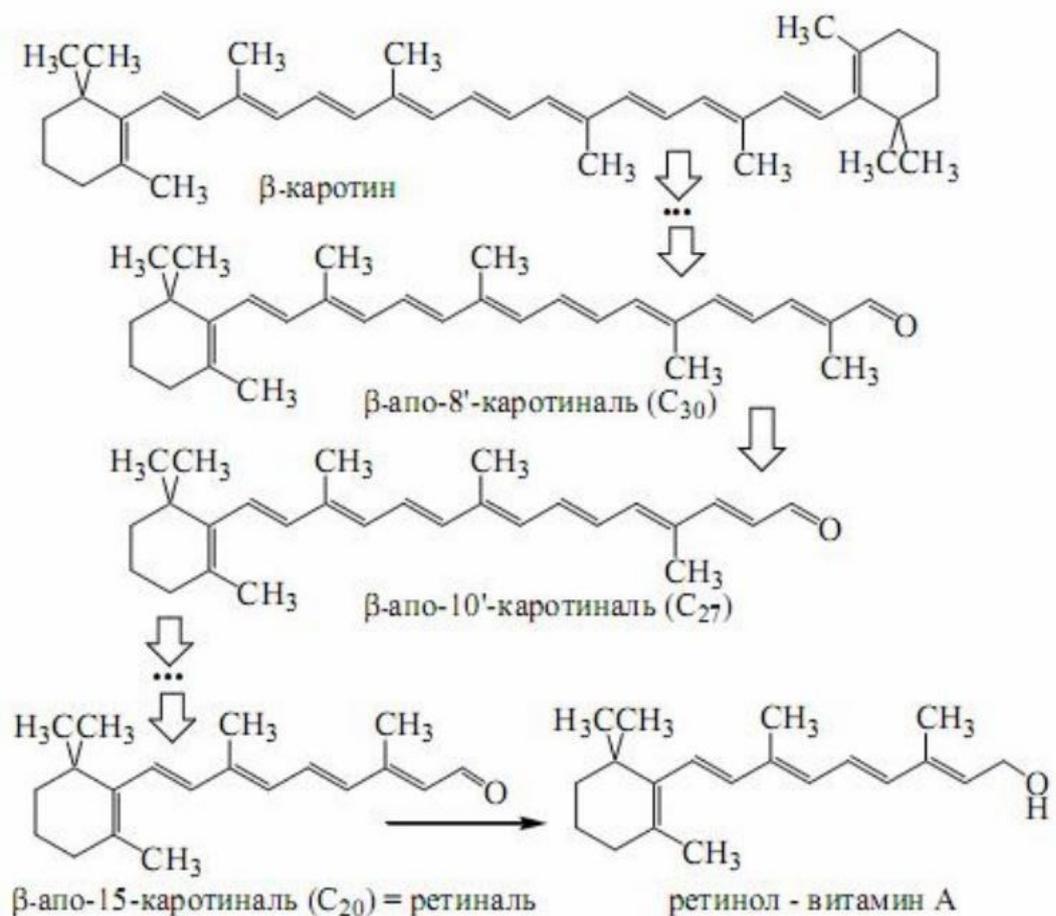
Каротиноїд, який містить з двох сторін два фрагменти (I), зветься лікопіном, і є початковим елементом у схемі їх катаболізму. Важливу роль у природі відіграють каротиноїди, що містять типовий циклогексеновий цикл у двох формах – структурах  $\alpha$ -іонових і  $\beta$ -іонових, III та II, відповідно. Замінники X та X' різноманітні; приміром,  $\alpha$  –  $\gamma$  – та  $\beta$  – каротини мають по два відмінних кінцевих фрагменти: II+III, I+II та I+III, відповідно. Найбільшу біологічну активність має  $\beta$  – каротин, з двома  $\beta$  – іоновими (II) фрагментами [10].

$\beta$  – каротин отримав вперше відокремлення від моркви Вакенродер (1831 р.), що знайшло свій відбиток в назві цієї сполуки. Емпіричну формулу та структуру визначено відповідно Вальдштеттером (1906 р.), Цихмейстером, Каррером і Куном (1928-1930 рр.). Саме він згурнував увагу через уявне ділення на дві симетричні частини, що означало можливість утворення двох молекул ретиналю або ретинолу з однієї молекули цієї речовини. Але реальний механізм перетворення  $\beta$  – каротину на ретиналь та ретинол досить комплексний, він включає окислювальну деструкцію, що починається з одного краю молекули через утворення апо- каротиналей [10].

Слід зауважити, що синтетичні  $\beta$  – апо-8'-каротиналь,  $\beta$  – апо-12'-каротиналь та етиловий етер  $\beta$  – апо-8'-каротинової кислоти широко використовуються у харчовій промисловості як пігменти [10].

Ензиматична трансформація  $\beta$  – каротину, який потрапив в організм, має важливе значення для тварин та людей. Передусім, вона відбувається у слизовій

оболонці тонкої кишки.  $\beta$  – каротин через центральний подвійний зв'язок (15-15' вуглецевими атомами молекули) в присутності кисню формує нестійкий чотиривуглецевий гетероцикл, який розпадається з утворенням двох молекул ретиналю. Цей процес є діоксигеназною реакцією, а відповідний фермент було виділено зі слизової кишки деяких ссавців. Доведено, що каротиноксидаза належить до тіолових ферментів (участь у реакції SH-груп) та залежна від іонів феруму. Для реакції потрібна також наявність жовчі [10].



**Рис.1.4. Окислююче розщеплення**

Велика частка ретиналю, що утворюється в слизовій, згодом перетворюється на ретинол, частина якого може окиснюватись до ретиноєвої кислоти. Ретинол переважно естерифікується з жирною кислотою, а отриманий естер первісно функціонує як транспортна форма (у хіломікронів), далі — як резервна (депонується в печінці). Зважаючи на те, що процеси окиснення

найчастіше супроводжуються небажаними реакціями, вітамінна активність  $\beta$ -каротину не удвічі більша, а удвічі менша за активність ретинолу [10].

Синтезувати каротиноїди "з нуля" тварини не можуть, отже мусять їх здобувати з їжею. На перших етапах біосинтез каротиноїдів полягає у подовженні ланцюга приєднанням ізопреноїдних фрагментів, для того, щоб утворився C20-каркас, димеризація якого дає фітоїн (він має на 4 подвійних зв'язки менше, ніж лікопін). Подальші перетворення можна зобразити у вигляді спрощеної схеми, котра розрізняє наступні процеси:

1. Підвищення ненасиченості – утворюється C=C зв'язок;
2. Циклізація фрагменту кінцевого (I II, I III);
3. В 3(або 3') положенні гідроксилювання циклогексанового фрагменту;
4. Епоксидування;
5. З'єднання епоксидів перегруповуються у фураноксидазну структуру.

Синтез каротиноїдів [10], крім рослин, також відбувається в клітинах певних фототрофних бактерій, водоростей, а також у деяких нефотосинтезуючих бактерій, дріжджів, актиноміцетів і нижчих грибів.

Останніми роками перед населенням України та світовою спільнотою постала серйозна проблема якості їжі. Споживання основних продуктів харчування залишається на низькому рівні, а раціони часто бувають незбалансованими, зокрема за вмістом бета-каротину.

Каротини, відомі як харчова добавка E160a, дозволені в продуктах харчування. Відповідно до законодавства, E160a складається з натуральних екстрактів каротинів або синтетичного  $\beta$ -каротину. Європейські норми класифікують цю добавку на: суміш каротинів – E160a(i), та  $\beta$ -каротин – E160a(ii). E160a(i) представляє собою суміш каротинів, до складу якої входять рослинні каротини. Їх видобувають шляхом екстракції з моркви, кропиви, рослинних олій і тд. Суміш, з якою  $\beta$ -каротин присутній у значній кількості, також може бути отримана екстракцією олією з *Dunaliella salina*.  $\beta$ -каротин міститься в E160a(ii), він синтезується за допомогою хімічних процесів, а також

$\beta$ -каротин із *Blakeslea trispora*.

На сьогодні, встановлено, що ключовою функцією  $\beta$ -каротину є його перетворення на вітамін А (ВА) в організмі. ВА є есенціальною сполукою, яка потрібна в мінімальних кількостях для забезпечення функціонування зору, підтримки клітинного росту, цілісності епітелію, виробництва еритроцитів, імунної відповіді та репродуктивних функцій організму.  $\beta$ -каротин має антиоксидантні властивості, що дозволяє йому запобігати окислювальному стресу, а також інактивувати різноманітні токсичні форми азоту, кисню та вільні радикали, вони утворюються під час життєдіяльності клітин. Антиканцерогенна дія  $\beta$ -каротину пов'язується саме з його антиоксидантною функцією [10].

Дослідження показали, що  $\beta$ -каротин виконує імуностимулюючу роль, оскільки активно залучається до процесів поділу імунних клітин, синтезу інтерферону, лізоциму, імуноглобулінів, та інших засобів захисту, як специфічного, так і неспецифічного, проти інфекцій. В фагоцитах він активує ферменти лізосом, що є необхідним для перетравлення патогенних мікроорганізмів. Крім того,  $\beta$ -каротин та інші поліпшують взаємодію між клітинами стимулюванням синтезу білків коннексинів. Каротиноїди сприяють міжклітинній взаємодії, підвищенням експресії генів, які кодують коннексин-білок, при цьому зазначений ефект, який не пов'язаний ні з вітаміном А, ні з антиоксидантними властивостями різних каротиноїдів.

## РОЗДІЛ 2

### ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА АГЕНТА

#### 2.1. Обґрунтування підбору агента та середовища для культивування

Станом на сьогодні понад 90% комерційного  $\beta$ -каротину виробляється за допомогою хімічного синтезу. Використання синтезованих хімічно  $\beta$ -каротинів у харчових добавках і функціональних косметичних засобах останнім часом стало під суворим контролем через зростання стурбованості суспільством щодо безпеки харчових продуктів. Це спонукало науковців шукати природні методи отримання  $\beta$ -каротину для великомасштабного виробництва. Завдяки генам каротиноїдів, що зустрічаються у каротинопродукуючих мікроорганізмах, альтернативний метод отримання  $\beta$ -каротину передбачає гетерологічну експресію, відповідальних за біосинтез  $\beta$ -каротину, у мікроорганізмах, які не здатні до синтезу даного продукту, наприклад, у *E. coli*. Щоб вибрати найбільш ефективний його штам, треба провести порівняльний аналіз. Порівняння здійснюється у три етапи. Різні продуценти оцінюються на 1 етапі за утворенням  $\beta$ -каротину. Ці показники включають тривалість процесу та концентрацію цільового продукту.

У таблиці 2.1 представлені різні штами, склади середовищ для них, технологічний процес та показники синтезу. При відборі цих біологічних агентів особливу увагу було приділено часу та концентрації  $\beta$ -каротину, необхідному для його утворення. Зокрема, *E. coli* YJM49 впродовж 52 години продукує 3,2 г/л. Штам CAR005-37 синтезує меншу кількість  $\beta$ -каротину – за 56 годин 2,1 г/л. Найменшу кількість продукту утворює штам CAR025-37, впродовж 48 годин 0,3 г/л.

Таблиця 2.1.

Продуктивність штамів *E. coli* та склад поживного середовища для їх синтезу

Біологічний агент	Склад поживного середовища		Тривалість культивування, год	Концентрація, г/л	Умови процесу біосинтезу	Використана література
	Компонент	Концентрація, г/л				
1	2	3	4	5	6	7
<i>E. coli</i> YJM49	Глюкоза	20	52	3,2	Температура процесу: 37 °C та 34 °C після індукції; pH 7 Концентрація розчиненого кисню - 20 % насиченості.	Yang, J., &Guo, L. Biosynthesis of $\beta$ -carotene in engineered <i>E. coli</i> using the MEP and MVA pathways. <i>Microbial Cell Factories</i> . 2014, 13(1). doi:10.1186/s12934-014-0160-x
	Гліцерин	50,4				
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9,8				
	Екстракт яловичини	5,0				
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>5</sub> [Fe (C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ) <sub>2</sub> ]	0,3				
	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> x H <sub>2</sub> O	2,1				
	MgSO <sub>4</sub>	0,06				
	Розчин мікроелементів, г/л:					
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ×4H <sub>2</sub> O	0,37				
	ZnSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,29				
	H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	2,47				
	CuSO <sub>4</sub> ×5H <sub>2</sub> O	0,25				
MnCl <sub>2</sub> ×4H <sub>2</sub> O	1,58					
<i>E. coli</i> CAR025-37	Гліцерин	2,5	48	0,3 г/л	Температура процесу: 30 °C; n = 250 об/хв.	Wu, T., Ye, L., Zhao, D., Li, S., Li, Q., Zhang, B., ... Zhang, X. (2017). <i>Membrane engineering - A novel</i>
	Триптон	10				
	Білковий екстракт	5,0				
	NaCl	5,0				

						<i>strategy to enhance the production and accumulation of <math>\beta</math>-carotene in Escherichia coli. Metabolic Engineering, 43, 85–91. doi:10.1016/j.ymben.2017.07.001</i>
<i>E. coli</i> CAR005	Гліцерину	500	56	2,1	Температура процесу: 37 °C; n = 600-1200 об/хв. рН на рівні 7,0 підтримували 5 М гідроксидом аміаку. Розчинений кисень підтримували на рівні 30 %.	Zhao, J., Li, Q., Sun, T., Zhu, X., Xu, H., Tang, J., ... Ma, Y. (2013). <i>Engineering central metabolic modules of Escherichia coli for improving <math>\beta</math>-carotene production. Metabolic Engineering, 17, 42–50. doi:10.1016/j.ymben.2013.02.002</i>
	Пептону	15				
	Дріжджового екстракту	30				
	MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	30				

Проте такі порівняння технологічного процесу неповні. Проводиться аналіз витрат на живильні середовища для вирощування обраних продуцентів на другому етапі(див. табл. 2.2).

Як видно з Таблиці 2.2, вартість одного літра середовища для утворення  $\beta$ -каротину штаму YJM49 найдешевша. Найвищу вартість має середовище, що використовується для отримання продукту за використання штаму CAR005.

Таблиця 2.2.

**Собівартість різних складів поживного середовища**

Штам	Речовина	Вміст речовини, г/л	Вартість речовини, грн/кг	Вартість речовини грн/л
YJM49	Гліцерин	50	95	5
	Глюкоза	20	20	0,4
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10	90	0,8
	Екстракт яловичини	5	7539,2	38
	H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	2,5	27	0,01
	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> * H <sub>2</sub> O	2,1	109	0,2
	MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	1,6	186	0,3
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> *4H <sub>2</sub> O	0,4	54	0,02
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>5</sub> [Fe(C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ) <sub>2</sub> ]	0,3	635	0,2
	ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,3	22	0,01
	CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	0,25	140	0,04
	MgSO <sub>4</sub>	0,06	120	0,01
	<b>Вартість 1 л – 45</b>			
CAR025-37	Триптон	10	4168	42
	NaCl	5	65	0,3
	екстракт дріжджовий	5	1000	5,0
	Гліцерин	2,5	95	0,25
	<b>Вартість 1 л – 47</b>			
CAR005	Гліцерин	500	95	48
	MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	30	8,50	0,3
	екстракт дріжджовий	30	1000	30
	Пептон	15	1944	29
	<b>Вартість 1 л – 107</b>			

\*Інтернет джерела

- <https://flagma.ua/uk/cukor-so424051-1.html>
- <https://kiev.flagma.ua/uk/sulfat-magniyu-sulfat-magniya-16-mg-32-s-o2889618.html>
- <https://prom.ua/p1114334499-glitserin-farmakopejnyj-pischevoj.html?&primelead=NS40;>

- <https://prom.ua/p1382898958-sulfat-tsinka-geptagidrat.html> ; <https://prom.ua/p1291301047-bornaya-kislota.html?&primelead=My4zMw> ; <https://prom.ua/p863490603-mednyj-kuporossulfat-medi.html>?
- <https://prom.ua/p1375331465-hlorid-natriya-1kg.html?&primelead=My4zNg>
- <https://www.systopt.com.ua/kalij-fosfornokyslyj-kaliyu-fosfat-2-zamishhenyj/>  
<https://www.systopt.com.ua/ru/item-marganets-hlorystyj-hloryd-margantsyu>
  - <https://himpromresursy.com.ua/wp-content/themes/hpr-child/assets/tables/prices/pdf/prod-prices-5-mast-group.pdf>
  - [http://metalab.com.ua/index.php?route=product/product&path=20\\_26\\_59&product\\_id=137](http://metalab.com.ua/index.php?route=product/product&path=20_26_59&product_id=137)
  - [https://klebrig.com.ua/p986551864-limonnaya-kislota-pischevaya.html?source=merchant\\_center&gclid=CjwKCAjwvMqDBhB8EiwA2iSmPC-sz4tXPWAIUYlrCzLMN2zxcj7VLGtpq5Ofknucg8P--X3MgGi8jxoCzXkQAvD\\_BwE](https://klebrig.com.ua/p986551864-limonnaya-kislota-pischevaya.html?source=merchant_center&gclid=CjwKCAjwvMqDBhB8EiwA2iSmPC-sz4tXPWAIUYlrCzLMN2zxcj7VLGtpq5Ofknucg8P--X3MgGi8jxoCzXkQAvD_BwE)
  - <https://www.agrohimprom.com/index.php/catalog/soli-metallov/ammonii-geptamolibdat-tetragidrat>
  - [http://agar.com.ua/Additives\\_for\\_microbiology\\_ru/Yeast\\_Extract\\_250](http://agar.com.ua/Additives_for_microbiology_ru/Yeast_Extract_250)  
[http://agar.com.ua/Peptone\\_fermentative?search=%D0%BF%D0%B5%D0%BF%D1%82%D0%BE%D0%BD](http://agar.com.ua/Peptone_fermentative?search=%D0%BF%D0%B5%D0%BF%D1%82%D0%BE%D0%BD)

На третьому етапі (табл. 2.3.) порівнюють продуценти за собівартістю одного граму синтезованого каротину.

Аналізуючи інформацію таблиць 2.1–2.3, робимо висновок – виробництво за допомогою штаму YJM49 має найвищу продуктивність та економічно вигідне порівняно з іншими, що виробляють цей продукт.

Морфологічні та культурологічні, а також фізіолого-біохімічні характеристики *E. coli*, як цільового продуцента  $\beta$ -каротину[11]:

- форма: пряма паличка;
- розміри: приблизно 1–3 мкм в довжину та 0,4–0,7 мкм в ширину;
- розташування клітин: поодинокі або в парах;
- рухливість: зазвичай рухлива, але деякі є нерухомими;
- джгутики: присутні, розташовані перитрихально;
- спори: не утворює;

- капсула: у деяких капсули виявляються, що можна встановити індійським чорнильним барвником;

- забарвлення є Грам-негативним.;

Таблиця 2.3.

**Розрахунок собівартості одного граму  $\beta$ -каротину**

Штам E. coli	Ціна 1 л, грн	Вміст $\beta$ -каротину, г/л	Ціна 1 г середовища, грн	Час культивування, год	Кількість створеного $\beta$ -каротину за 1 год., г/л
CAR005	107	2,1	51	56	0,06
CAR025-37	47	0,3	157	48	0,01
YJM49	45	3,2	14	52	0,06

Специфічні вимоги– бактерії не є вимогливими до умов вирощування;

оптимальний діапазон температури –10-40°C, для більшості температура становить 37°C, при якій здебільшого відбувається їх культивування;

оптимальний рівень рН – витримують від 4,5 до 9,5, проте максимальний ріст більшості при рН 7,0, що відповідає нейтральному середовищу;

киснева потреба – ці бактерії - факультативні анаероби.



Рис.2.1. Культура E. coli під мікроскопом (60x)

Порівняння морфолого-культуральних ознак *E. coli* на різних середовищах

Параметри	МПА	Еозино-метиленовий синій агар	Агаризоване середовище МакКонкі	Кров'яний агар
Форма	Паличкоподібні	Паличкоподібні	Паличкоподібні	Паличкоподібні
Розмір	1-3 мм	2-3 мм	2-3 мм	1-3 мм
Висота	Опуклі	Опуклі	Опуклі	Опуклі
Поверхня	Гладка (у «свіжої» колонії); Груба (повторна субкультура) Мукоїдні колонії (зачасту капсульовані)	Гладка (у «свіжої» колонії); Груба (повторна субкультура) Мукоїдні колонії (зачасту капсульовані)	Гладка (у «свіжої» колонії); Груба (повторна субкультура) Мукоїдні колонії (зачасту капсульовані)	Гладка (у «свіжої» колонії); Груба (повторна субкультура) Мукоїдні колонії (зачасту капсульовані)
Колір	Сірувато білий	Зелений з металевим блиском	Рожевий	Сірувато білий
Структура	Напівпрозорі	Непрозорі	Непрозорі	Напівпрозорі
Здатність до гемолізу	-	-	-	β-гемоліз (у деяких штамів)
Емульгування	Гладкі форми – легко емульгуються; Шорсткі форми – піддаються автозклеюванню, тому не емульгуються складно.	Гладкі форми – легко емульгуються; Шорсткі форми – піддаються автозклеюванню, тому не емульгуються складно.	Гладкі форми – легко емульгуються; Шорсткі форми – піддаються автозклеюванню, тому не емульгуються складно.	Гладкі форми – легко емульгуються; Шорсткі форми – піддаються автозклеюванню, тому не емульгуються складно.

У лабораторних умовах для культивування *E. coli* найчастіше застосовують середовище МакКонкі.



**Рис. 2.2. Колонії *E. coli* на кров'яно-агарному середовищі**

На кров'яно-агарному середовищі деякі штами *E. coli* проявляють  $\beta$ -гемоліз, ті що відібрали під час патологічних процесів особливо[11].



**Рис. 2.3. Колонії *E. coli* на МакКонкі**

На середовищі МакКонкі *E. coli* набувають рожевого кольору внаслідок ферментації лактози, що є важливим критерієм для відмінності *E. coli* від бактерій, які присутні у зразках [11].



**Рис. 2.4. Культура *E. coli* на агаризованому середовищі з еозино-метиленовим синім**

На агаризованому середовищі з еозино-метиленовим синім колонії *E. coli* виростають з блиском зеленим металевим, що пояснюється метахроматичними властивостями барвників (метиленового синього і еозину) та можливістю *E. coli* до ферментації лактози, що призводить до зниження рН середовища до кислого [11].

## **2.2. Таксономічний статус агента Домен - Bacteria;**

Тип – Proteobacteria; Царство – Bacteria; Клас – Gammaproteobacteria; Сімейство – Enterobacteriaceae; Порядок – Enterobacteriales; Вид – *E. coli*; Рід – *Escherichia*; Штам – *E. coli* YJM49 [12].

Домен та царство: належать до домену та царства бактерій, є одноклітинним мікроорганізмом, що характеризується наявністю органел, специфічних для цієї групи.

Тип: відносять до типу Proteobacteria, адже представники її грамнегативні (G-) бактерії із мембраною, яка містить переважно ліпополісахариди.

Клас: *E. coli* відносять до класу Gammaproteobacteria, оскільки члени є факультативно анаеробними G-бактеріями.

Порядок: Enterobacteriales, представники – факультативно анаеробні паличкоподібні G- бактеріями.

Сім'я: Вид *E. coli* відносять до родини Enterobacteriaceae, адже представники цієї родини характеризуються рухливістю завдяки перитрихальним джгутикам. Оптимальна для росту температура - 37 °C. Крім того, ці бактерії проявляють оксидазо-негативні властивості, є каталазопозитивними і здатні зменшувати вміст нітратів.

Рід: *Escherichia*, що названий на честь Теодора Ешеріха, до неї відносять умовно-патогенні мікроорганізми, які колонізують кишковий тракт ссавців.

Вид: один із п'яти у роду *Escherichia*. Її унікальність полягає в специфічній біохімічній активності: вона ферментує лактозу, має лізиндекарбоксилазу, негативно реагує на тест Фогеса-Проскауера, індукує утворення індолу, не розмножується на нітратах і не утворює H<sub>2</sub>S.

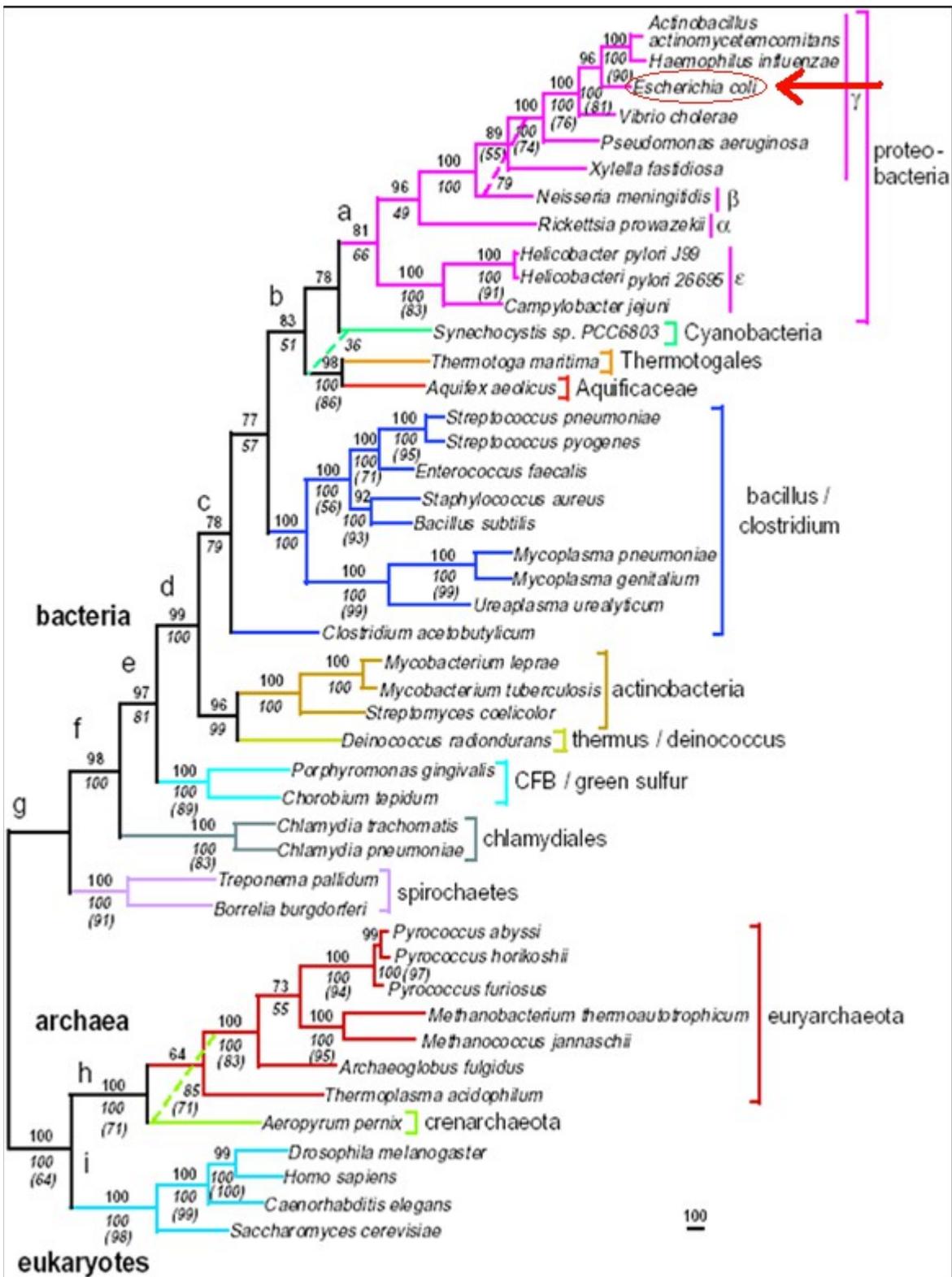


Рис.2.5. Знаходження у філогенетичному дереві *E. coli* [12].

## РОЗДІЛ 3

### ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

#### 3.1. Визначення потреб виробництва продукта

$\beta$ -каротин є каротиноїдною сполукою, що міститься у значних кількостях у різних продуктах харчування. Завдяки цьому, він виявляється в усіх тканинах людського організму, зокрема у крові. Як провітамін А,  $\beta$ -каротин виконує в організмі широкий спектр функцій, найважливіша пов'язана з розвитком ембріона, нормальний ріст та зорові функції [13].

Сьогодні  $\beta$ -каротин найчастіше використовується як харчова добавка через свої антиоксидантні властивості, оскільки він допомагає уповільнити окислювальні процеси в клітинах організму. Крім того, він може слугувати безпечним харчовим барвником, додаючи продуктам жовто-помаранчеве забарвлення. Однак надмірне накопичення каротину призводить до розвитку каротінемії. Це захворювання, хоча і не вважається небезпечним, викликає зміни кольору шкіри, роблячи її більш жовтуватою. Висока споживаність даної добавки не рекомендується для осіб, що належать до групи ризику захворювань на рак (курці, особи, які зловживають алкоголем). Результати досліджень показали, що значне споживання  $\beta$ -каротину може підвищувати ймовірність розвитку раку легень [14]. Однак наразі немає даних, які підтверджували б, що це стосується всього населення.

У статті [15], присвяченій натуральним харчовим барвникам, зазначається, що сьогодні  $\beta$ -каротин активно використовується як барвник в різноманітних продуктах, зокрема:

- соки;
- безалкогольні напої;
- олія;
- майонез;
- морозиво.

Слід також підкреслити, що використання  $\beta$ -каротину як барвника має

деякі переваги. Цей барвник демонструє високу стабільність, що дозволяє йому довше зберігати колір.  $\beta$ -каротин не взаємодіє з вітаміном С, завдяки чому він не втрачає свою яскравість.

Враховуючи широкий спектр продуктів, у яких застосовують  $\beta$ -каротин, а також ускладнення у визначенні точних доз, які виробники додають для досягнення потрібного забарвлення, при розрахунку  $\beta$ -каротину ми спиратимемося на статистичні дані щодо виробництва майонезу та маргарину. Згідно з статистичними даними, у 2020 році обсяги виробництва маргарину склали 121 тисячу тонн, а у 2018 році виробництво майонезу досягло 122,5 тисяч тонн. Враховуючи, що кількість барвників, доданих до продукції, варіюється залежно від виробника та бажаного кольору, для обчислення кількості барвника використовуємо значення дозування, воно коливається в межах 3-25 мг на кілограм продукту [17]. Середнє значення визначається за формулою  $(25 + 3)/2 = 14$  мг/кг.

#### ***Розрахунок потужності виробництва***

Таким чином, визначаємо загальну потребу барвнику для цих продуктів, використовуючи середню кількість барвника, необхідного на один кілограм продукту.

$(121\ 000 \text{ тонн (маргарину)} + 122\ 500 \text{ тонн (майонезу)}) \times 14 \text{ г} = 3\ 409\ 000 \text{ г}$   
(річна потреба барвника).

Для обчислення необхідного барвника використовуємо зазначений річний обсяг. У зв'язку з конкурентами, було вирішено обрати 25 % від необхідної кількості:  $3\ 409\ 000 \text{ г} \times 25 \% = 852\ 250 \text{ г}$ .

Враховуючи, що для досягнення забарвлення використовується жиророзчинний барвник, який містить 30 %  $\beta$ -каротину, проведемо розрахунок кількості  $\beta$ -каротину, необхідної для барвника 852 250 г.

$852\ 250 \text{ г} \times 30 \% = 255\ 675 \text{ г}$  (річна потреба в  $\beta$ -каротині)

#### **Визначення розміру ферментера та кількості циклів**

Визначивши річну потребу на рівні 255 675 г, розраховуємо кількість трудоднів на рівні  $\text{Трд} = 100$  днів. Ця кількість є доцільною економічно, адже на наведеному обладнанні можливо в інший час виробляти інші продукти.

Розрахуємо кількість циклів на рік:

$$N_{\text{цк}} = 24 \times \text{Трд} / \text{Тцф} = 24 \times 100 / 59 = 40,67. \text{ Приймаємо } N_{\text{цк}} = 41.$$

$\text{Тцф}$  – цикл ферментера, складається з: підготовки (7 годин) та час біосинтезу (52 год).  $K_1 = 1,3$  коефіцієнт, який показує кількість проведення нестерильних операцій.

Приготування ферментера до роботи включає: аналіз герметичності (30 хвилин), зовнішній вигляд та миття (1,5 год), стерилізацію (1 година), підігрів апарату (30 хвилин), розміщення середовища (90 хвилин), зниження температури (0,5 год), розташування бактерій на середовище (30 хвилин) та вивантаження продуценту (60 хвилин).

Розрахуємо циклову кількість продукту:

$V_{\text{цк}} = V_{\text{нт}} / N_{\text{цк}} = 255,675 \text{ кг} / 41 = 6,24$ . Об'єм конденсату, який зливають за процес ферментації (цикл), літрів:

$$V_{\text{кр}} = K_1 \times V_{\text{цк}} \times R_{\text{гп}} / R_{\text{кр}} (1 - E_{\text{св}}) = 1,2 \times 6,24 \times 99 / 0,32 \times 0,7 = 3\,309,4.$$

Розрахунок робочого об'єму ферментера,  $V_{\text{ф}}$ , літрів:

$$V_{\text{ф}} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 3\,309,4 / 0,9 = 3\,677,1.$$

Приблизний розмір ферментера:

$$V_{\text{пф}} = V_{\text{ф}} / K_{\text{ф}} = 3\,677,1 / 0,6 = 6\,128,5 \text{ л.}$$

Вибираємо найближчий стандартний об'єм ферментера,  $\text{м}^3$ :

$$V_{\text{гф}} = 6,3.$$

Коефіцієнт заповнення  $K_{\text{уф}}$ , частка:

$$K_{\text{уф}} = V_{\text{ф}} / V_{\text{гф}} = 3\,677,1 / 6\,300 = 0,58.$$

### ***Визначення кількості стадій підготовки матеріалу***

Протягом циклу отримали 3 309,4 літра рідини. Під час ходу цього процесу враховуються втрати ( $E_{\phi}$ ), через краплинос від колектора використаного повітря, вони становлять 10%.

Таким чином, обсяг посівного матеріалу та поживного середовища перед

$$V_{\text{роб.1}} = \frac{V_{\text{пц}}}{1 - E_{\phi}} = \frac{3\,309,4}{1 - 0,1} = 3\,677,1 \text{ л}$$

початком біосинтезу визначають таким чином:

При заданому коефіцієнті  $K_{\text{зап}} = 0,6$  ми розрахуємо потенційний об'єм ( $V_{\phi}$ ), він становитиме:

$$V_{\phi} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{3\,677,1}{0,6} = 6\,128,5 \text{ л}$$

Ми приймаємо найближчий стандартний об'єм  $V_{\phi} = 6,3 \text{ м}^3$  та уточнюємо попередній коефіцієнт наповнення:

$$K_{\text{нап}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{V_{\phi}} = \frac{3\,677,1}{6\,300} = 0,58$$

Кількість матеріалу ферментера ( $E_{\phi 1}$ ) дорівнює 10 % від обсягу середовища. Отже, кількість середовища:

$$V_{\text{пс1}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{1 + E_{\phi 1}} = \frac{3\,677,1}{1 + 0,1} = 3\,342,8 \text{ л}$$

Посівного матеріалу:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 3\,677,1 - 3\,342,8 = 334,3 \text{ л}$$

Для отримання 334,3 літра інокуляту в апараті необхідно врахувати втрати, пов'язані з краплиносом ( $E_{\phi 2}$ ), вони становлять 10 %. Тому обсяг поживного середовища і посівного матеріалу буде:

$$V_{\text{роб.2}} = \frac{V_{\text{пм1}}}{1 - E_{\phi}} = \frac{334,3}{1 - 0,1} = 371,4 \text{ л}$$

З урахуванням обраного коефіцієнта заповнення  $K_{\text{зап}} = 0,6$  розраховуємо об'єм ( $V_{\phi}$ ):

$$V_{\phi1} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{371,4}{0,6} = 619 \text{ л}$$

Обираємо за об'ємом найближчий  $V_{\phi1} = 0,63 \text{ м}^3$  та уточнюємо попередньо прийнятий коефіцієнт наповнення:

$$K_{\text{нап}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{V_{\phi1}} = \frac{371,4}{630} = 0,59$$

Об'єм посівного матеріалу ( $E_{\phi2}$ ) становить 10 % від обсягу поживного середовища. Відповідно, поживного середовища:

$$V_{\text{пс2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{1 + E_{\phi2}} = \frac{371,4}{1 + 0,1} = 337,6 \text{ л}$$

Об'єм посівного матеріалу дорівнює:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 371,4 - 337,6 = 33,8 \text{ л}$$

Для отримання 33,8 л слід врахувати втрати, що виникають внаслідок краплевиносу ( $E_{\phi3}$ ), які складають 10 %. Таким чином, обсяг посівного матеріалу та середовища:

$$V_{\text{роб.3}} = \frac{V_{\text{пм2}}}{1 - E_{\phi3}} = \frac{33,8}{1 - 0,1} = 37,6 \text{ л}$$

За обраним коефіцієнтом заповнення  $K_{\text{зап}} = 0,6$  ми розраховуємо об'єм ( $V_{\phi}$ ), який становить:

$$V_{\phi2} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{37,6}{0,6} = 62,7 \text{ л}$$

З урахуванням цього, приймаємо найближчий ферментер  $V_{\phi2} = 0,06 \text{ м}^3$  і коригуємо заздалегідь прийнятий коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап} = \frac{V_{роб.3}}{V_{ф2}} = \frac{37,6}{60} = 0,62$$

Об'єм посівного матеріалу (Еф3) також становить 10 % від обсягу поживного середовища. Таким чином, поживного середовища:

$$V_{пс3} = \frac{V_{роб.3}}{1+E_{ф3}} = \frac{37,6}{1+0,1} = 34,2 \text{ л}$$

Посівного матеріалу:

$$V_{пм3} = V_{роб.3} - V_{пс3} = 37,6 - 34,2 = 3,4 \text{ л}$$

Щоб отримати 3,4 л інокуляту треба врахувати втрати, що виникають внаслідок краплевиносного процесу через колектор (Еф3), які дорівнюють 10 %. Посівного матеріалу і поживного середовища становитиме:

$$V_{роб.4} = \frac{V_{пм3}}{1 - E_{ф3}} = \frac{3,4}{1 - 0,1} = 3,8 \text{ л}$$

З обраним коефіцієнтом заповнення  $K_{зап} = 0,6$ , розраховуємо об'єм ( $V_{ф}$ ), який дорівнює:

$$V_{ф4} = \frac{V_{роб.4}}{K_{зап}} = \frac{3,8}{0,6} = 6,33 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий ферментер за об'ємом,  $V_{ф4} = 5,6 \text{ л}$ , і коригуємо раніше прийнятий коефіцієнт наповнення:

$$K_{нап} = \frac{V_{роб.4}}{V_{ф4}} = \frac{3,8}{5,6} = 0,67$$

Посівного матеріалу (Еф4) - 10 % від об'єму середовища. То, поживного середовища:

$$V_{пс4} = \frac{V_{роб.4}}{1+E_{ф4}} = \frac{3,8}{1+0,1} = 3,45 \text{ л}$$

Посівного матеріалу:

$$V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб.4}} - V_{\text{пс4}} = 3,8 - 3,45 = 0,35 \text{ л}$$

Об'єм інокуляту, необхідного для засіву маленького інокулятора  $V_{\text{пм4}}$ , становить 0,35 л, і його можна отримати шляхом культивування у качалочних колбах штаму YJM49. Користуємося колбами з об'ємом  $V_{\text{колб}} = 750$  мл з коефіцієнтом наповнення  $K_{\text{нап}} = 0,2$ .

Відповідно, кількість колб, потрібних для виготовлення посівного матеріалу:

$$N = \frac{V_{\text{пм3}}}{V_{\text{колб}} * K_{\text{зк}}} = \frac{350}{750 * 0,2} = 2,3$$

Щоб отримати необхідну кількість посівного матеріалу знадобиться 3 колби.

Отже, для виробництва  $\beta$ -каротину виготовлення посівного матеріалу у ферментері 6,3 м<sup>3</sup> за коефіцієнта наповнення 0,6 відбуватиметься у 4 етапи.

### **3.2. Вибір схеми технологічної**

#### **Спосіб та умови культивування**

Перед вибором ферментера для виробництва  $\beta$ -каротина бактеріями штаму YJM49 слід чітко визначити умови та параметри проведення процесу. Вони залежать від морфологічних і культуральних характеристик мікроорганізму-продуцента, а також фізико-хімічних особливостей кінцевого продукту. Розглянемо ці параметри детальніше.

Промислове вирощування та культивування штаму проводиться у аеробних умовах від 37 до 34° та з рН на рівні 7,0. Для забезпечення росту мікроорганізмів здійснюється постачання стерильного повітря через барботер і масопередача його турбінними мішалками.

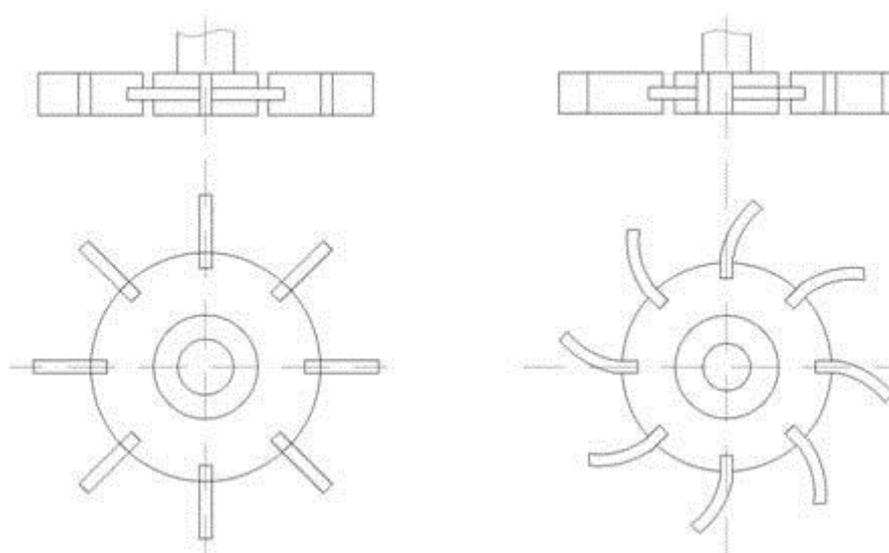
Зважаючи на те, що при заданих температурах і рівнях рН відбувається активний ріст більшості мікроорганізмів, для запобігання контамінації необхідно провести стерилізацію обладнання, комунікацій і поживних середовищ, що використовуються для культивування.

Промисловий процес виробництва  $\beta$ -каротину реалізується за допомогою періодичного глибинного методу, що забезпечує накопичення необхідного рівня біомаси.

Для ефективного виробництва  $\beta$ -каротину застосовується глибинний спосіб культивування в періодичному режимі в стерильних умовах із постійною аерацією середовища.

### **Обґрунтування вибору типу ферментера**

Конструкція визначається умовами культивування. Вибір обладнання ґрунтується на фізіолого-біохімічних характеристиках організму-продуцента. Після визначення методу культивування обирається для біореактора відповідне оснащення, що відповідає створеним умовам. Оскільки *E. coli* YJM49 це факультативний анаероб, для нього необхідні шляхи подачі повітря до ферментера. Саме тому ферментер має бути оснащений барботером. Для контролювання рН біореактор має датчик рН.



**Рис. 3.1. Турбінні мішалки відкритого типу**

Щоб забезпечити дисперсність кисню та інтенсифікувати масообмін,

ферментер необхідно обладнати перемішуючим пристроєм із частотою 220 об/хв. Через те, що біосинтез не підвищує в'язкість культуральної рідини, установка перемішуючого пристрою спеціальної конструкції не є обов'язковою. Відтак, для забезпечення ефективного перемішування рідини доцільно використовувати мішалку турбінну відкритого типу

Ферментери з зазначеними характеристиками можна придбати у компанії «Fermentec Co Ltd». Їх біореактори відзначаються високим ступенем захистом доступу до управління, а також надійним захистом від непередбачених відключень. Передбачені порти у ферментерах для забору проб, датчики моніторингу температури, рН, розчиненого кисню і рівня піни, присутня автоматизована стерилізація.



**Рис.3.2. Приклади біореакторів Fermentec Co Ltd**

Розрахунок кількості етапів підготовки посівного матеріалу

Процес проходить у ферментері  $10 \text{ м}^3$ , коефіцієнт заповнення 0,5. За цього коефіцієнта робочий об'єм ( $V_{\text{роб.}}$ ) становить:

$$V_{\text{роб}} = 10 \times 0,5 = 5 \text{ м}^3$$

Посівного матеріалу, який внесли в середовище - 10%, тоді для

одержання культуральної рідини об'ємом 5 м<sup>3</sup> треба:

$$V_{p1} = 5 \times 0,1 = 0,5 \text{ м}^3$$

Такий об'єм можна підготувати у інокуляторі 1 м<sup>3</sup>.

Для підготовки 500 л рідини треба створити:

$$V_{pоб2} = 500 \times 0,1 = 50 \text{ л матеріалу для засіву}$$

Така кількість інокуляту може бути виготовлена в 100 літровому інокуляторі.

$$V_{pоб3} = 50 \times 0,1 = 5 \text{ л}$$

Інокулят виробляється в інокуляторі 10 л. Для одержання культуральної рідини в обсязі 5 л:

$V_{p4} = 5 \times 0,1 = 500$  мл посівного матеріалу. Можна отримати таку кількість, вирощуючи у 5 колбах продуцента на качалці 750 мл, коефіцієнт заповнення - 0,1.

Таблиця 3.1

**Розрахунки об'єму обладнання для біосинтезу та підготовки м<sup>3</sup>**

Загальний об'єм устаткування	Відсоток використання	Робочий об'єм	Посівний матеріал (10 %)	Конденсат (10 %)	Поживне середовище
0,01	50	0,005	0,001	-	0,004
0,1		0,05	0,01	0,01	0,03
1		0,5	0,1	0,1	0,3
10		5	1	1	3

Отже, одержання для біосинтезу посівного матеріалу у ферментері 10 м<sup>3</sup>, коефіцієнт заповнення = 0,5, складається з чотирьох етапів.

Обґрунтування вибору етапу підготовки повітря для аерації

Промислове вирощування та культивування *E. coli* YJM49 проводять в аеробних умовах, тому важливо передбачити етап підготовки повітря для аерації. Підготовка його буде реалізована в окремих приміщеннях (компресорних станціях), оскільки потреби у постачанні повітря будуть

значними.

Етапи підготовки включають: Відбір повітря використовуючи труби з обладнаної повітрязбірником, розташованим на максимально можливій висоті приблизно 17 метрів (висота поверху становить 6 метрів, поверхів — 2, з висотою 12 метрів кожен, а з урахуванням косоного даху будівлі (+3 метри) — 15 метрів; процес відбору повітря має відбуватись вище найвищої точки на 2-3 метри). Там встановлене обладнання для стиснення та очищення повітря.

Очищення від пилу (діаметром більше 50 мкм) виконується за рахунок використання тканинних фільтрів.

Стиснення повітря в турбоповітродувках або компресорах, що супроводжується його нагріванням до температури в межах 120–200°C.

Потім стиснене повітря охолоджується до температури, що відповідає "точці роси", для конденсації.

Далі у ресивері відбувається видалення парів мастила та вологи, що потрапили з компресора. Цей компонент зменшує також пульсації повітря, які можуть негативно впливати на функціонування фільтрів очищення повітря.

В кінці, стабілізація температури і тиску здійснюється шляхом нагрівання до 45–50°C за допомогою пари в спеціальних теплообмінниках.

У головних фільтрах, розміщених поруч з ферментаційними відділеннями, досягає ступеня очищення повітря  $E=95\%$ . Додаткове очищення індивідуальних фільтрів ( $E=99,99\%$ ), які встановлені на ферментері, здійснюється через подачу повітря від головних через трубопроводи.

У лабораторіях і боксах, де проводять роботи з посівними культурами, повітря стерилізується за допомогою ультрафіолетових ламп.

Щодо стерилізації та підготовки поживного середовища, найбільш високий показник синтезу (3,2 г/л) досягається під час росту *E. coli* YJM49 на середовищі, яке має наступний склад (г/л):

Глюкоза - 20,

Гліцерин - 50,4,

$K_2HPO_4$  - 9,8,

Екстракт яловичини - 5,0,

$(NH_4)_6[Fe(C_6H_4O_7)_2]$  - 0,3,

$C_6H_8O_7 \times H_2O$  - 2,1,

$MgSO_4$  - 0,06.

Також включається розчин мікроелементів у концентрації 1 мл/л середовища (г/л):

$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4H_2O$  - 0,37,

$ZnSO_4 \times 7H_2O$  - 0,29,

$H_3BO_4$  - 2,47,

$CuSO_4 \times 5H_2O$  - 0,25,

$MnCl_2 \times 4H_2O$  - 1,58.

Згідно з розрахунками, представленими в першому розділі, процес виробничого біосинтезу здійснюється в ферментері 6,3 м<sup>3</sup>. Інокулянт виготовляють у 4 етапи: спочатку на качалках в колбах, далі в інокуляторах 5,60 л, і на завершальному етапі в посівному апараті 630 л.

Підготовка та стерилізація середовища для отримання інокуляту на качалках в колбах має свої специфічні вимоги. Для отримання початкового матеріалу використовують середовище, згадане раніше. Стерилізація здійснюється в автоклаві через малий об'єм. Враховуючи параметри стерилізації компонентів, розділимо його на композиції:

Композиція А: Глюкоза,  $C_6H_8O_7 \times H_2O$  екстракт яловичини, - стерилізація: 30 хв, 112 °С.

Композиція Б:  $K_2HPO_4$  - стерилізація: 40 хв, 131 °С.

Композиція В:  $(NH_4)_5[Fe(C_6H_4O_7)_2]$ ,  $MgSO_4$  - стерилізація: 40 хв, 131 °С.

Розчин глюкози (композиція А) є термолабільним, тому вимагає делікатної стерилізації. Солі (композиція В) стерилізуються при стандартній температурі для солей. Фосфати у композиції Б стерилізуються окремо, щоб уникнути утворення нерозчинних фосфатів кальцію та магнію.

До складу композиції входить також гліцерин та розчин мікроелементів, приготування яких відбуватиметься протягом всього технологічного процесу в єдиній ємності.

Кількісний склад компонентів у розчині є в таб. 3.2. Приготування розчину проводиться в колбі 1 літр, в яку вносять необхідні порції мікроелементів, після чого додають 0,5 літра води, ретельно перемішують та переливають в колбу 5 літрів, додаючи ще 3,22 літра води. Потім розчин в автоклаві стерилізують. Цей розчин передбачений для всього технологічного процесу, тому подається при отриманні посівного матеріалу та під час біосинтезу. Орієнтовний термін зберігання складає 4 дні.

Розчину гліцерину не потрібна стерилізація, тому можна його зберігати в резервуарі протягом всього технологічного процесу для зменшення економічних витрат.

*Таблиця 3.2.*

***Розрахунок вмісту мікроелементів у різних об'ємах середовища***

Компонент середовища, г/л	Стадії підготовки поживного середовища, л					Всього:
	0,35 л	3,45 л	34,2 л	337,6 л	3342,8 л	
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}-0,37$	0,13	1,28	12,65	124,91	1 236,84	1 375,81 мг
$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}-0,29$	0,1	1	9,9	97,9	969,4	1 078,3 мг
$\text{H}_3\text{BO}_4-2,47$	0,86	8,52	84,47	833,87	8 256,72	9 184,44 мг
$\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}-0,25$	0,09	0,86	8,55	84,4	835,7	929,6 мг
$\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}-1,58$	0,55	5,45	54,04	533,41	5 281,62	5 875,07 мг

Вирощування інокуляту в апараті 60 л. Для цього етапу потрібно 34,2 л середовища. Розподіл композицій відбувається аналогічно до попереднього етапу, однак об'єднуються 2 композиції солей в одну. Композицію А стерилізують і готують у реакторі-змішувачі окремо. Композицію Б - у новому

збірнику, а її стерилізація проводиться в інокуляторі для запобігання контамінації. Стерилізацію проводять при рН 4,5 для запобігання утворенню осаду. Для підкислення середовища використовується 6%-й розчин хлоридної кислоти.

Після завершення стерилізації складових частин у інокуляторі відбувається подача композиції А за допомогою перистальтичного насоса, при цьому рН доводять до 6,8 шляхом додавання 6%-ого натрій гідроксиду.

Вирощування інокуляту проводять у апараті 630 л. Для нормального функціонування посівного апарата об'ємом 0,63 м<sup>3</sup> потрібно 337,6 л поживного середовища; процес поділу композицій здійснюється так само, як і для 60 л посівного апарата.

Композиція А містить: глюкозу, екстракт яловичини,  $C_6H_8O_7 \times H_2O$ , і стерилізується при 112 °С протягом 30 хв.

Композиція Б складається з  $K_2HPO_4$ ,  $(NH_4)_5[Fe(C_6H_4O_7)_2]$ ,  $MgSO_4$  і стерилізується при 131 °С протягом 40 хв.

Композицію А стерилізують і готують у реакторі-змішувачі окремо. Композицію Б - у новому збірнику, а її стерилізація проводиться в інокуляторі для запобігання контамінації. Стерилізацію проводять при рН 4,5 для запобігання утворенню осаду. Для підкислення середовища використовується 6%-й розчин хлоридної кислоти.

Після завершення стерилізації в інокулятор, додають до них композицію А, використовуючи перистальтичний насос та регулюють рН до 6,8 внесенням 6%-ного розчину натрію гідроксиду.

#### Особливості стерилізації та підготовки середовища для біосинтезу

Для здійснення промислового біосинтезу необхідно приготувати 3 342,8 л поживного середовища. Через значний обсяг поживного середовища, економічно вигідніше проводити стерилізацію у безперервній установці стерилізації. Це дозволяє зменшити використання води та пари, а також

зменшити час на обробку середовища. Обираємо установку УБС-5, продуктивність - 5 м<sup>3</sup>/год, де час стерилізації складе 65 хвилин. Температура стерилізації становить 130 °С.

Всі компоненти готують в 1 реакторі-змішувачі, а потім подаються до системи безперервної стерилізації. Після якої середовище направляють до виробничого ферментера.

### ***Вибір розчинів для регулювання рН та піногасника***

Виходячи з розподілу компонентів середовища та режиму стерилізації, слід відзначити необхідність включення в технологічний процес титрувальних агентів: 6%-вого розчину NaOH і 6%-вого HCl.

Готуючи середовище треба провести стерилізацію композицій. Щоб уникнути осадження фосфатів магнію, заліза та марганцю в процесі підняття температури солі у апараті, слід перед стерилізацією додати розчин 6%-вий HCl. Оскільки оптимальне значення рН *E. coli* YJM49 приблизно 6,8, необхідно до внесення посівного матеріалу збільшити рН поживного середовища за допомогою 6%-вого NaOH.

*Таблиця 3.3.*

### ***Розрахунок на об'єм середовища***

Об'єм середовища, л	NaOH		HCl (6%)	
	Об'єм, мл	Особливість приготування	Об'єм, мл	Особливість приготування
0,35	-	-	-	-
3,34	-	-	-	-
34,2	68,4	у колбі на 2 л	68,4	у колбі на 2 л
337,6	675,2		675,2	
3 342,8	-	-	-	-

### 3.3. Специфікація обладнання

Таблиця 3.4.

#### Специфікація обладнання для виробничого біосинтезу

Позиція	Найменування	Кількість	на характеристика (виробник)
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень
Ф-2	Фільтр грубої очистки	1	Фільтр панельний ФВП-99-48-G4, фільтрувальний матеріал – хімволокно (поліестер), зафіксований на сітці, знаходиться в рамці з товщиною 48 мм; продуктивність – 7600 м <sup>3</sup> /год; E = 90 % [18]
К-3	Компресор	1	Компресор гвинтовий Comprac F-3710; продуктивність 5,5 м <sup>3</sup> /хв, робочий тиск – 10 бар, габарити: 1400*1000*1500 мм; потужність приводу – 37 кВт [19]
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Осушувач RDX 65, продуктивність 6,5 м <sup>3</sup> /хв, робочий тиск 14 бар, потужність приводу – 1,1 кВт [20]
Рс-5	Ресивер	1	Ресивер РВ 6000/8, об'єм – 6 м <sup>3</sup> , сталь, робочий тиск – 0,8 МПа [21]
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Теплообмінник AVS 160, габарити: 265x290x304 мм; продуктивність 430 м <sup>3</sup> /год, оцинкована сталь, потужність 7,46 кВт [22]
Ф-7	Фільтр головний	1	Фільтр комірковий ФВК-3-592-592- (300/600)-6-(F9); фільтрувальний матеріал – Meltblown, зшитий у вигляді комірок, в оцинкованій рамці; продуктивність – 3400 м <sup>3</sup> /год; E = 95 % [23]
ІФ-8 ІФ-12 ІФ-18 ІФ-27	Фільтр індивідуальний	1	Фільтр МКР-305x305x78-H14, фільтрувальний матеріал – поліестер, зшитий у вигляді комірок, в оцинкованій рамці; площа фільтрування – 2,6 м <sup>2</sup> , продуктивність – 130 м <sup>3</sup> /год; E = 99,995 % [24]
ІН-9	Інокулятор для вирощування посівного матеріалу	1	Об'єм апарату – 5 л; матеріал – нержавіюча сталь; перемішування здійснюється за допомогою лопатевої мішалки – 20-1000 об/хв; витримує тиск – 0,3 МПа, виробник – BIORUS [25]

Н-10	Насос перистальтичний для перекачування розчину від ІН-9 у інокулятор ІН-13	1	Перистальтичний насос Dynamik. Максимальний тиск – до 3 бар, продуктивність 10 л/год [26]
Р-11	Реактор-змішувач для розчинення розчину солей	1	Реактор з нержавіюча сталь 316L об'ємом 5 л; виробник – Тирит; діаметр 450 мм, висота 1430 мм; оснащений сорочкою та якірною мішалкою [27]
ІН-13	Посівний апарат	1	Об'єм апарату – 60 л; матеріал – нержавіюча сталь; перемішування здійснюється за допомогою лопатевої мішалки – 20-1000 об/хв; витримує тиск – 0,3 МПа, виробник – BIORUS [25]
ДЗ-14 ДЗ-16 ДЗ-23	Об'ємно-ваговий дозатор		Дозатор ваговий автоматичний. Мінімальна межа дозування – 0,2 кг, максимальна – 50 кг. Розміри: 870*870*2100 мм; дискретність відліку 0.005 г. [28]
Р-15	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації розчину глюкози і дріжджового екстракту	1	Реактор сталевий емальований об'ємом 25 л, виконаний на замовлення в «ГК Єврохімаш К.О.» (Україна); довжина – 520 мм; висота – 650 мм; ширина – 450 мм; оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв; потужність двигуна 0,75 кВт [29]
Р-17	Реактор-змішувач для розчину	1	Об'єм апарату – 10 л; матеріал – нержавіюча сталь; перемішування здійснюється за допомогою магнітної муфти за швидкості – 300 об/хв; діаметр – 219 мм, висота – 380 мм; витримує тиск – 0,39 МПа, виробник – МашХим [30]
ІН-19	Інокулятор для вирощування посівного матеріалу	1	Об'єм апарату – 630 л; матеріал – нержавіюча сталь 316L; висота – 2790 мм, діаметр - 1380 мм; витримує тиск до – 0,3 МПа; перемішування забезпечується лопатевою мішалкою 75 об/хв; обладнаний датчиками температури, тиску, рН, кисню, піни, стерильний відбір проб забезпечується спеціальним пробовідбірним клапаном, виробник – BioTechno Group [31]
Р-20	Реактор-змішувач для зберігання гліцерину	1	Об'єм апарату – 250 л; матеріал – нержавіюча сталь 316L; частота обертання якірної мішалки – 50 об/хв.; витримує тиск – 0,6 МПа; діаметр – 700 мм, висота – 2578 мм; виробник – ТД Красный Октябрь [32]

Н-21	Насос перистальтичний для перекачування розчину гліцерину у інокулятори	1	Перистальтичний насос MPC-6. Швидкість обертання 86 об/хв, продуктивність 108 л/год [33]
ДЗ-22	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Дозатор ваговий автоматичний ДВМ-50. Мінімальна межа дозування – 5 кг, максимальна – 100 кг. Розміри: 1800x940x1950 мм. [34]
Р-24	Реактор-змішувач для приготування компонентів поживного середовища перед УБС	1	Об'єм апарату – 5,0 м <sup>3</sup> ; матеріал – нержавіюча сталь 316L; частота обертання турбінної мішалки – 320 об/хв.; витримує тиск – 0,6 МПа; діаметр – 2220 мм, висота – 4555 мм; виробник – ООО «Дзержинскхиммаш-Комплект» [35]
Н-25	Насос відцентровий для перекачування розчину від Р-24 у в УБС-26	1	Відцентровий насос ВРС 32/12-220; Продуктивність 7000 л/год [36]
УБС-26	Установка безперервної стерилізації	1	Продуктивність – 5 м <sup>3</sup> /год; тиск пари – 0,5 МПа; ширина – 1500 мм, довжина – 2000 мм; висота – 2500 мм. [37]
Ф-28	Ферментер	1	Об'єм апарату – 6,3 м <sup>3</sup> ; матеріал – нержавіюча сталь 316L; виконаний на замовлення в «ГК Єврохіммаш К.О.» (Україна); висота – 4960 мм, діаметр - 1800; витримує тиск до – 0,6 МПа; перемішування забезпечується механічною мішалкою, швидкість перемішування 200-400 об/хв; обладнаний датчиками, тиску, рН, кисню, піни, стерильний відбір проб забезпечується спеціальним пробовідбірним клапаном [38, 39]

### 3.4. Контроль виробництва

Під час культивування штаму YJM49 необхідно проводити мікробіологічний контроль раз в 4 год на кожному етапі.

Мікробіологічний контроль проходить шляхом висіву на середовища культуральної рідини та мікроскопічного дослідження. Для цього пробу рідини за допомогою петлі переносять у чашку Петрі, ізолюючи колонії, використовуючи для проявлення бактерій - м'ясо-пептонний агар (МПА) та для дріжджів і грибів - сусло-агар (СА) [40].

Дослідження зразків проводять з використанням імерсійного мікроскопа і 90-кратного об'єктива. Штам YJM49 (рис. 3.3) – це грамнегативна паличка, розміри якої становлять 1-3 x 0,4-0,7 мкм, зазвичай знаходиться поодинокі або в парах. Бактерія має рухливість завдяки перитрихіальному розміщенню джгутиків, однак деякі штами все ж не є рухливими. Не утворює спори. До першого типу відносять фімбрії і присутні у нерухливих та рухливих штаммах [41].



Рис. 3.3. Фото мікроскопії зафарбованого за Грамом *штаму* YJM49

### Контроль середовища

Для контролю відбирають 50 мл простерилізованого середовища. Засівають 0,1 мл у чашку Петрі, заповнену сусло-агаром для виявлення грибків та дріжджів, а також на м'ясо-пептонний агар для проявлення бактерій. Чашки обгортають у папір та ставлять до термостата, де інкубують при температурі 28–30 °C протягом 1–2 діб - МПА та 24–26 °C протягом 3–5 діб - СА. Візуально оцінюють на відсутність росту мікроорганізмів поверхню поживних середовищ [40].

Концентрація біомаси. Вимірювання концентрації біомаси проводять на основі оптичної густини клітинної суспензії, використовуючи фотоелектроколориметр - довжина хвилі 600 нм. Після цього здійснюється перерахунок на суху біомасу за калібрувальним графіком [40].

Концентрація синтезованого продукту. Методом рідинної хроматографії

з використанням високої ефективності (ВЕРХ) визначають кількість  $\beta$ -каротину, який синтезували визначається. Спочатку біомасу відокремлюють шляхом центрифугування (10 хв, з частотою 5 тис. об.), а далі з клітин каротин екстрагують за допомогою ацетону. Потім зразки підлягають повторному центрифугуванню (10 хв, з частотою 14 тис. об). Вміст  $\beta$ -каротину у отриманому супернатанті аналізують при 30 °С, використовують «Agilent Technologies Series 1200» та колонкою «Symmetry C18» [42]. Для рухомої фази використовують суміш ацетонітрилу, метанолу і дихлорметану у співвідношенні 21:21:8 зі швидкістю 1 мл/хв.

Концентрація джерела вуглецю. Джерела вуглецю в середовищі мають глюкозу та гліцерин. Глюкози концентрацію вимірюємо глюкозооксидазним методом, який базується на окисненні глюкози та утворенні пероксиду водню. Далі, за наявності пероксидази, пероксид водню окиснює ортотолуїдин, що призводить до формування забарвлення. Інтенсивність поглинання у спектрі світла на довжині 625 нм пропорційна до концентрації глюкози, визначається за допомогою калібрувального графіку, який побудований на основі стандартних розчинів з точною концентрацією глюкози [43].

Концентрацію гліцерину визначають спектрофотометрично, використовуючи комбінацію реакцій Малапрада (перетворення гліцерину на формальдегід через реакцію з перйодатом натрію) і Ганцша (перетворення отриманого формальдегіду у барвник). Для проведення аналізу вносять у пробірку супернатанту 200 мкл, який отримали центрифугуванням біомаси при 5000 g протягом 5 хвилин. Далі додають розчин натрію перйодату 200 мкл, приготованого шляхом розчинення перйодату у дистильованій воді з подальшим додаванням 10%-ного розчину оцтової кислоти. Суміш ретельно перемішують та залишають на 10 хв. Далі до суміші додають розчин ацетилацетону в ізопропіловому спирті 625 мкл, після чого знову перемішують. Оптичну густину визначають на спектрофотометрі з довжиною 410 нм хвилі. Концентрацію гліцерину розраховують за калібрувальним графіком, який створений на основі стандартних розчинів гліцерину [44].

Концентрація джерел азоту. Основним джерелом N в поживному середовищі є екстракт яловичини, визначаємо мідним методом кількість амінного азоту. Суть цього процесу, що до супернатанту, який отримали відділенням біомаси та підлужненням розчином NaOH 0,1 М, додають надлишково суспензію  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  ортофосфату міді у борному буферному розчині. Це приводить до формування мідних сполук, які потім відділяються фільтрацією. Потім вносять оцтову кислоту до фільтрату, вона забирає мідь від комплексного з'єднання, перетворюючи її на ацетат міді. Для розрахунку обсягу міді, що приймала участь у реакції, додається йодид калію до розчину. У результаті такої реакції вивільняється йод у кількості, еквівалентній міді та амінокислотного азоту. Цей азот титрують тіосульфатом натрію, та розраховують аміний азот в мг/л [45].

## ВИСНОКИ ТА ПРОПОЗИЦІЇ

1. Порівнюючи різні штами *E. Coli*, щодо ефективності синтезу  $\beta$ -каротину, встановили найефективніший штам YJM49. Він утворює 3,2 г/л впродовж 52 годинного циклу. Меншу продуктивність мав штам CAR005-37, що синтезує 2,1 г/л з циклом 56 годин. Найменш перспективним є штам CAR025-37. Він має найкоротший цикл – 48 годин, але і продуктивність теж найнижча – 0,3 г/л.

2. Порівняння вартості поживного середовища для культивуванні різних штамів показало, що найдешевше середовище для штаму YJM49 (45 грн.), дещо дорожче для штаму CAR025-37 (48 грн.) і найдорожчим є середовище штаму CAR005 (107)

3. Порівняння між штамами за комплексним показником, вмістом  $\beta$ -каротину, що синтезується за одну годину, встановило кращий штам YJM49 (0,06 г/л).

4. Річна потреба у  $\beta$ -каротині визначена на рівні 256 кг. Для отримання такої кількості необхідно 41 ферментаційний цикл. Кількість отриманого продукту за цикл становить 6,24 л. Для забезпечення виробництва необхіден ферментер 6,3 м<sup>3</sup>.

5. Для забезпечення виробництва ферментером місткістю 6,3 м<sup>3</sup>, при його заповненості 60%, потрібно буде 4 етапи культивування посівного матеріалу.

## ПРОПОЗИЦІЯ

Виробникам  $\beta$ -каротину використовувати для синтезу штам *E. Coli* YJM49, як найбільш ефективний.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Пирог Т. П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: Підручник. К.: НУХТ, 2009. 336 с.
2. Губський Ю.І. Біологічна хімія: Підручник / Губський Ю. І. Київ Вінниця: НОВА КНИГА, 2007. 656 с.
3. Солодовніченко Н.М. Лікарська рослинна сировина та фітопрепарати. Посібник з фармакогнозії з основами біохімії рослин / Н.М. Солодовніченко, М.С. Журавльов, В.М. Ковальов. Х.: Вид-во НФАУ: Золоті сторінки, 2001. 408 с.
4. Bunea A. Lutein Esters From *Agrostes erecta* L.: Isolation and Enzymatic Hydrolysis / Andrea Bunea // Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies. 2008. №65 (1–2) P. 410–414.
5. Буднікова Т.М. Використання вета-каротину при екозалежних патологіях / Т.М. Буднікова, О.П. Савицький // Гигиена населених місць. Київ, 2000. Вип. 36. С. 183–189.
6. Zimmermann M.B. Interactions of vitamin A and iodine deficiencies: effects on the pituitary-thyroid axis / M.B. Zimmermann // Int. J. Vitam. Nutr. Res. 2007, 77(3): 236–240.
7. Rodriguez-Amaya D.B, Kimura M. HarvestPlus handbook for carotenoid analysis. Harvest techn, monograph 2. Washington, DC and Cali: IFPRI and CIAT. HarvestPlus, 2004. 58 p.
8. Бриттон Г. Біохімія природних пігментів. М.: Мир, 1986. 442 с.
9. Bogacz-Radomska, L., & Harasym, J.  $\beta$ -Carotene—properties and production methods. Food Quality and Safety. 2018, 2(2): 69–74. doi: 10.1093/fqsafe/fyy004
10. Jaap Keijer; Annelies Bunschoten; Andreu Palou; Nicole L.W. Franssen-van Hal. Beta-carotene and the application of transcriptomics in risk–benefit evaluation of natural dietary components. 2005, 1740(2): 0–146. doi:10.1016/j.bbadis.2005.01.002
11. Pappori Bora, P. Das. Biocolour: The natural way of colouring food. Journal of

Pharmacognosy and Phytochemistry. 2019, 8(3): 3663-3668.

12. <https://factoria.kiev.ua/beta-karotin/>
13. [https://www.el-vent.ru/ventilyaciya-i-kondicionirovanie/filtry-dlya-ventilyacii/gruboy-ochistki/klass-g4-eu4/filtr-vozdushnyj-panelnyj-fvp-fyap- vp-klass-ochistki-g2-g5-iz-him-volokna/#tabs-tehnicheskie\\_harakteristiki](https://www.el-vent.ru/ventilyaciya-i-kondicionirovanie/filtry-dlya-ventilyacii/gruboy-ochistki/klass-g4-eu4/filtr-vozdushnyj-panelnyj-fvp-fyap- vp-klass-ochistki-g2-g5-iz-him-volokna/#tabs-tehnicheskie_harakteristiki)
14. <https://www.compressortyt.ru/stanciya/kompr/vintovye/comprag/f-3710/>
15. <https://kms-market.com.ua/p504451339-osushitel-rdx.html>
16. <https://drobesfera.ru/product/resiver-dlya-kompressora-na-6000-litrov-8-bar-vertikalnyy>
17. <https://www.realvent.ru/catalog/ventilyaciya/teploobmenniki/vodyanye-nagrevateli/salda/avs-160-71372/>
18. <https://www.el-vent.ru/ventilyaciya-i-kondicionirovanie/filtry-dlya-ventilyacii/tonkoy-ochistki/klass-f9-eu9/filtr-vozdushnyj-karmannyj-fvk- fyak-tonkoj-ochistki-f5-f9-na-lente/>
19. [https://www.el-vent.ru/ventilyaciya-i-kondicionirovanie/filtry-dlya-ventilyacii/filtry-absolyutnoj-ochistki/filtr\\_vozdushnyj\\_absolyutnoj\\_ochistki\\_hepa\\_mkr\\_klass\\_ochistki\\_h11\\_h13\\_h14/](https://www.el-vent.ru/ventilyaciya-i-kondicionirovanie/filtry-dlya-ventilyacii/filtry-absolyutnoj-ochistki/filtr_vozdushnyj_absolyutnoj_ochistki_hepa_mkr_klass_ochistki_h11_h13_h14/)
20. <https://bio-rus.ru/oborudovanie/fermenteryi-i-bioreaktoryi/pilotnyie-fermenteryi-i-bioreaktoryi-biorus%C2%AE/pilotnyie-bioreaktoryi.html>
21. <http://logrus.ua/ru/peristaltic-pump-dynamik/>
22. [https://tirit.org/reactor\\_him/lab\\_steel\\_gomo.php](https://tirit.org/reactor_him/lab_steel_gomo.php)
23. [https://artmash.ua/category/dozatory?utm\\_source=google&utm\\_medium=cp&keyword=%2B%D0%B2%D0%B0%D0%B3%D0%BE%D0%B2%D0%B8%D0%B9%20%2B%D0%B4%D0%BE%D0%B7%D0%B0%D1%82%D0%BE%D1%80&utm\\_campaign=%D0%B4%D0%BE%D0%B7%D0%B0%D1%82%D0%BE%D1%80\\_%D1%83%D0%BA%D1%80&gclid=CjwKCAiA2O39BRBjEiwApB2lkoL7YZVDQaZBCjZ1cSRCfVLsszsHp3nzLIc2GiFSTHOFqvEJb6ny6RoCBKAQAvD\\_BwE](https://artmash.ua/category/dozatory?utm_source=google&utm_medium=cp&keyword=%2B%D0%B2%D0%B0%D0%B3%D0%BE%D0%B2%D0%B8%D0%B9%20%2B%D0%B4%D0%BE%D0%B7%D0%B0%D1%82%D0%BE%D1%80&utm_campaign=%D0%B4%D0%BE%D0%B7%D0%B0%D1%82%D0%BE%D1%80_%D1%83%D0%BA%D1%80&gclid=CjwKCAiA2O39BRBjEiwApB2lkoL7YZVDQaZBCjZ1cSRCfVLsszsHp3nzLIc2GiFSTHOFqvEJb6ny6RoCBKAQAvD_BwE)

24. [http://euromash.kiev.ua/ru/aparati\\_emal\\_mehanicheskim\\_perem\\_ustroystvom\\_ru.php](http://euromash.kiev.ua/ru/aparati_emal_mehanicheskim_perem_ustroystvom_ru.php)
25. <https://mash-him.ru/reaktory-i-avtoklavy-vysokogo-davleniya>
26. <https://biotechno.ru/catalog/emkosti-i-rezervuary/ctatsionarnyy-reaktor-s-funktsiyami-cip-sip-obem-630-l/>
27. <https://tdredoctober.com/catalog/reaktor-nerzhaveyushchiy-s-meshalkoy/reaktor-nerzhaveyushchiy-s-meshalkoy-v0063-m3-025-m3.html>
28. <http://www.kolossal.com.ua/index.php?page=production&id=17&sid=47>
29. <https://foodbay.com/uk/minsk/search/upakovochnoje-oborudovanije/fasovochno-upakovochnyje-avtomaty/dozatory/vesovoj-doзатор-dvm-50-23714.html>
30. <https://chimmash.ru/meshalka.htm>
31. <https://f.ua/ua/nasosiy/bps-32-12-220-043-gayka-up-4.html>
32. <http://sdlcentrifuge.ru/9-continuous-sterilization-system/192767/>
33. [http://euromash.kiev.ua/ru/aparati\\_perem\\_ustroystvom\\_ru.php](http://euromash.kiev.ua/ru/aparati_perem_ustroystvom_ru.php)
34. <https://tdredoctober.com/catalog/reaktor-nerzhaveyushchiy-s-meshalkoy/reaktor-nerzhaveyushchiy-s-meshalkoy-v63-m3.html>
35. Красінько, В. О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс] : конспект лекцій для здобувачів освіт. ступ. "Бакалавр" спец. 162 "Біотехнології та біоінженерія" освіт.-проф. програми "Біотехнологія" ден. і заоч. форм навч. / В. О. Красінько ; Нац. ун-т харч. технол. Київ: НУХТ 2019. 252 с.
36. Escherichia Coli (E. Coli): Meaning, Morphology and Characteristics. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.biologydiscussion.com/bacteriology/systematic-bacteriology/escherichia-coli-e-coli-meaning-morphology-and-characteristics/30821>
37. Yang, J., & Guo, L. Biosynthesis of  $\beta$ -carotene in engineered E. coli using the MEP and MVA pathways. Microbial Cell Factories. 2014, 13(1). doi:10.1186/s12934-014-0160-x.
38. Пирог Т.П., Антонюк М.М., Ігнатенко С.В. Лабораторний практикум для

студ. напряму підготовки 6.051401 "Біотехнологія" ден. форми навч. Київ : НУХТ, 2010. 127 с.

39. Lopar M, Špoljarić IV, Ceganec N, Koller M, Braunegg G, Horvat P. Study of metabolic network of *Cupriavidus necator* DSM 545 growing on glycerol by applying elementary flux modes and yield space analysis // J. Ind. Microbiol. Biot. 2014. Vol. 41, N 6. P. 913–930.