

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»

«До захисту допущено»

Директор інституту (декан факультету)

Завідувач кафедри

Наталія ГРЕГІРЧАК

Віктор СТАБНІКОВ

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

« » лютий 2022 р.

« » лютий 2022 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Промислова біотехнологія»

на тему: Досягнення біотехнології для одержання жиророзчинних вітамінів

Виконав: здобувач II курсу, групи ЗПБ-2-1м

ІРКЛІЄНКО Наталія Петрівна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник СТАБНІКОВ Віктор Петрович

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти _____

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

Рецензент _____

(прізвище та ініціали)

(підпис)

Я, як здобувач(ка) Національного університету харчових технологій, розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавав(-ла) і не одержував(-ла) недозволеної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

Здобувач _____

(підпис)

Київ – 2022 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(шифр і назва)

Освітньо-професійна програма: «Промислова біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

«03» листопада 2021 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ІРКЛІЄНКО Наталії Петрівні

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Досягнення біотехнології для одержання жиророзчинних вітамінів

керівник роботи СТАБНІКОВ Віктор Петрович, проф., д.т.н.,

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом вищого навчального закладу від «02» листопада 2021 року №
865-кс

2. Строк подання здобувачем роботи 1 лютого 2021 року

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Blakeslea trispora* K2, цільовий продукт: β- каротин

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ 1. Біотехнологічне виробництво жиророзчинних вітамінів. РОЗДІЛ 2. Технологічні особливості отримання вітаміну групи А. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування випуску β-каротину. РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми. РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми. РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва β-каротину – аркуша формату А1. Апаратурна схема виробництва β-каротину – аркуша формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання «03» листопада 2021 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Біотехнологічне виробництво жиророзчинних вітамінів	04.11.2021-12.11.2021	
2.	Технологічні особливості отримання вітаміну групи А	13.11.2021-19.11.2021	
3.	Техніко-економічне обґрунтування випуску β -каротину	20.11.2021-30.11.2021	
4.	Обґрунтування вибору технологічної схеми	01.12.2021-04.12.2021	
5.	Специфікація обладнання	05.12.2021-07.12.2021	
6.	Опис технологічної схеми	04.12.2021-08.12.2021	
7.	Контроль виробництва	09.12.2021-17.12.2021	
8.	Оформлення пояснювальної записки	18.12.2021-20.12.2021	
9.	Виконання графічної частини проекту	21.12.2021-03.01.2022	

Здобувач

(підпис)

Наталія ІРКЛІЄНКО

(ім'я та прізвище)

Керівник роботи

(підпис)

Віктор СТАБНІКОВ

(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці біотехнологічного виробництва β -каротину, шляхом культивування *Blakeslea trispora* K2. Даний біологічний агент синтезує β -каротин в концентрації 6,3 г/л. Собівартість 1 г продукту *Blakeslea trispora* K2 на 0,02 та 0,05 грн менше відповідно за *Rhodotorula glutinis* ВКПМ Y-608 та *Rhodospiridium diobovatum* ІМВ Y-5023. Особливостями культивування є: температура 28°C, рН 6,1-6,4, перемішування 220-240 об/хв, додавання стимуляторів синтезу β -каротину після 36 год культивування.

Технологічний процес включає проведення контролю споживання джерела вуглецю – зеленої патоки, та джерела азоту – кукурудзяного екстракту – методом іонообмінної хроматографії, біомаси ваговим методом та β -каротину методом високоефективної рідинної хроматографії.

Кваліфікаційна робота включає в себе 91 сторінку друкованого тексту, включаючи 19 таблиць та 8 рисунків, складається з вступу, 7 розділів, списку використаної літератури (91 найменувань) та графічної частини (90 листа формату А1).

Ключові слова: жиророзчинні вітаміни, *Blakeslea trispora* K2, β -каротин, культивування.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	3
ВСТУП	6
ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	
РОЗДІЛ 1. БІОТЕХНОЛОГІЧНЕ ВИРОБНИЦТВО ЖИРОРОЗЧИННИХ ВІТАМІНІВ	8
1.1. Продуценти β -каротину.....	8
1.2. Отримання жиророзчинного вітаміну К.....	15
1.3. Особливості біотехнології жиророзчинного вітаміну D.....	21
РОЗДІЛ 2. ТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ ВІТАМІНУ ГРУПИ А	30
2.1. Біотехнологічні аспекти виробництва β -каротину.....	30
ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА	
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИПУСКУ В-КАРОТИНУ	37
3.1. Потреба у β -каротині.....	37
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	42
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	42
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	43
РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	46
4.1. Обґрунтування вибору біологічного агента, поживного середовища для його культивування та перевірочний розрахунок складу поживного середовища..	46
4.2. Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера.....	53
4.3. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту.....	55
4.4. Обґрунтування вибору товарної форми випуску β -каротину (упаковки).....	62
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	65
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	68
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	82
7.1. Мікробіологічний контроль.....	82

7.1.1. Мікроскопіювання нативних препаратів.....	82
7.1.2. Висів на поживні середовища.....	82
7.2. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	83
7.2.1. Концентрація біомаси.....	83
7.2.2. Концентрація цільового продукту.....	83
7.2.3. Концентрація джерела вуглецю та азоту.....	84
7.3. Контроль готового продукту.....	84
7.3.1. Технологічний контроль.....	84
7.3.2. Фізико-хімічний контроль.....	85
7.3.3. Біологічний контроль.....	87
7.4. Карта постадійного контролю.....	87
ВИСНОВКИ.....	90
ЛІТЕРАТУРА.....	91
ДОДАТКИ	

ВСТУП

Каротиноїди – це група розчинних у ліпідах природних терпеноїдних пігментів. У цій групі β-каротин є попередником вітаміну А, відіграє важливу роль у захисті клітин і тканин від перекисів як антиоксидант [1].

Бета-каротин відіграє важливу роль в забезпеченні багатьох фізіологічних функцій організму. Він забезпечує нормальний ріст організму і розвиток плода, підвищує активність статевих гормонів, підвищує стійкість до інфекційних захворювань, володіє антимутагенної, антиканцерогенними і радіопротекторну активностями. Сполученими подвійними зв'язками $C = C$ молекула бета-каротину поглинає різні вільні радикали, захищаючи таким чином, клітку від мутагенного і канцерогенної дії іонізуючої радіації і хімічних мутагенів [2].

Одним з перших явних ознак нестачі бета каротину в людському організмі є зниження гостроти зору, особливо нічного зору. Гостра нестача може призвести до незворотної сліпоти. Якщо недолік бета-каротину не заповнити, можливий навіть летальний результат. Зазвичай при дефіциті шкіра стає білою і сухий, розвиваються кон'юнктивіти, підвищена сприйнятливість до інфекцій, відбувається уповільнення зростання і спостерігаються розлади репродуктивної функції [3].

На відміну від вітаміну А, надлишки в організмі його провітамінів не викликають виникнення токсичного ефекту, а лише призводять до фарбування шкіри в жовтий колір, що є оборотним і не небезпечно для здоров'я. Перетворення провітаміну вітаміну А в вітамін А відбувається в міру необхідності. При цьому всмоктуваність його досить невелика, тому ризик серйозного передозування практично відсутній [3].

Застосування бета каротину розповсюджене в олійно-жировій, кондитерській, м'ясомолочній, продуктоконсервній, фармацевтичній, нутрицевтичній, косметичній та в галузі тваринництва [4].

					<i>НУХТ БТЕК 06.01.03 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Ірклієнко Н.П.</i>			<i>ВСТУП</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>					6	90
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

Синтез бета каротину можливий хімічним та біотехнологічним способом. Хімічний синтез каротину складний та дороговартісний, тому використовують біотехнологічне одержання за допомогою мікроорганізмів. Продуцентів бета каротину дуже багато, це можуть бути бактерії, дріжджі, гриби та водорості. Комерційний β -каротин в основному виробляють з використанням каротиногенних мікроорганізмів, таких як *Blakeslea trispora*, *Rhodotorula glutinis*, *Sphingomonas sp.* та *Phycomyces blakesleeanus*. Одне з найбільш перспективних природних комерційних джерел -каротину отримано з вилицева цвіль *B. trispora*. Ці гетероталічні зигомікоти мають два типи спарювання, що називаються "плюс" і "мінус", які добре відомо, що протягом року виробляється -каротин у промислових масштабах спарювання (+) та (-) штаму міцелію [4, 5].

Новизна роботи: використання змішаного штаму *Blakeslea trispora* K2, що має підвищену продуктивність по бета каротину – 6,3 г/л, а собівартість 1 г β -каротину *Blakeslea trispora* K2 на 0,02 та 0,05 грн менше відповідно за *Rhodotorula glutinis* ВКПМ Y-608 та *Rhodospiridium diobovatum* ІМВ Y-5023 [2].

РОЗДІЛ 1

БІОТЕХНОЛОГІЧНЕ ВИРОБНИЦТВО ЖИРОРОЗЧИННИХ ВІТАМІНІВ

1.1 Продуценти β -каротину

Активними біосинтетиками каротиноїдів також являються бактерії видів *Micrococcus glutamicus*, *M. roseum*, *Mortirela rommaniana*, бактерії роду *Pseudomonas*, фітопатогенні мікоплазми сімейства *Acholeplasmataceae* та *Mycoplasmataceae*, актиноміцети помаранчевої групи, проактиноміцети, корінеформні бактерії та дріжджі: *Actinomyces aur. coverticillatus*, *A. aureomonopodiales*, *A. chryzomallus*, *Corinebacterium poinsetiae*, *Streptomyces medilary*. Продукуються каротиноїди також дріжджами роду *Sporobolomyces*, *Rhodotorulla* (*R. glutinis*, *R. flava*, *R. rubra*, *S. roseus*) та ін. Каротиноїди містяться в хлоропластах водоростей *Cyanophyta*, *Euglena*, *Chlorella*, *Ulva*, *Sconodesmus*, *Dunaliella salina* та ін [6].

Водорості *Dunaliella salina* використовується в країнах з теплим кліматом та тривалим періодом інтенсивної сонячної активності для отримання каротиновмісної біомаси, каротиноїдних паст та інших комерційних продуктів. З використанням цієї водорості вихід бета-каротину сягає 14 % (у перерахунку на абсолютно суху біомасу). Водорості вирощують у великих водоймищах, поблизу солоних озер в місцях з високою сонячною активністю. Для збагачення водорості каротином використовують дуже цікавий захід — різко прибавляють концентрацію солі у воді. Біомаса дуналієли містить (в 1 кг) до 30 г каротину, 400 г гліцерину, велику кількість білку [7]. Були відпрацьовані технології виробництва вітамінних концентратів на основі біомаси *Dunaliella salina* з різним вмістом каротиноїдів (80 мг/г; 200 - 250 мг/г біомаси). Перспективним джерелом каротиноїдів може бути й інша водорість — спіруліна; вміст каротиноїдів в біомасі цієї водорості складає 300—600 мг % [10].

<i>НУХТ БТЕК 06.01.03 КР ПЗ</i>					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	
Розроб.		Ірклієнко Н.П.			
Перевір.		Стабніков В.П.			
Реценз.					
Н. Контр.					
Затверд.		Стабніков В.П.			
РОЗДІЛ 1 БІОТЕХНОЛОГІЧНЕ ВИРОБНИЦТВО ЖИРОРОЗЧИННИХ ВІТАМІНІВ			Літ.	Арк.	Аркушів
				8	90
			<i>Кафедра БТМ</i>		

На початку 60-х років вчені прийшли до висновку, що всі ці водорості, бактерії та гриби не можуть бути використаними в промислових ферментаційних процесах з причини низької швидкості та продуктивності біосинтезу бета-каротину. Найбільш продуктивним продуцентом бета-каротину являється муковий гриб *Blakeslea trispora* (*Choanephora trispora*) класу *Phycomycetes*. Звичайно, й інші гриби роду *Choanephoraceae* (*C. cucurbitarum*, *C. circinans*, *C. infudibulifera*, *C. heterospora*) спроможні синтезувати каротиноїди, особливо при сумісному вирощуванні “плюс” та “мінус” форм в аерованій культурі та на сприятливому середовищі живлення. Суттєву роль для грибів цього роду в продукції каротиноїдів відіграють статеві гормони — триспорові кислоти [89].

Для культивування грибу *Blakeslea trispora* спочатку використовували в'язкі та збагачені рослинними оліями та поверхнево-активними речовинами субстрати. Потім на ранніх стадіях біосинтезу в ферментері почали вводити в ці середовища стабілізатори та стимулятори каротиногенезу: альфа- та бета-іони [6].

Промислове виробництво мікробіологічного бета-каротину реалізується методом зануреного культивування в періодичному режимі вирощування. Технологічний процес починається із стадії вирощування відокремлених (+) та (–) статевих форм гриба *B. trispora* в пробірках із скошеним суловим агаром протягом семи діб [8].

Отримання каротиноїдів іншим способом являється хімічний синтез. Синтетичним шляхом виробництво бета-каротину стало можливим завдяки дослідженням в галузі біосинтезу вітаміну А та завдяки вивченню закономірностей хімії полієнових сполук. В 1960 році Каррер та Інхоффен відпрацювали метод синтезу вітаміну А і, цим, забезпечили можливість хімічного синтезу каротиноїдів. Однак доведення молекули синтетичного бета-каротину до активної форми потребує значних матеріальних витрат [11]. Для виробництва синтетичного бета-каротину сировиною являються продукти нафтохімії: ізобутилен, ацетон, циклогексан, ацетилен та ін. Ще один спосіб промислового виробництва бета-каротину — це біосинтез за допомогою мікроорганізмів: грибів, водоростей.

Біосинтез за допомогою мікроорганізмів — найбільш перспективний шлях отримання каротиноїдів [7].

Проводяться наразі роботи, спрямовані на зменшення вартості препаратів каротиноїдів, отриманих мікробіологічним шляхом. Це досягається використанням методів генної інженерії. Генно-інженерні роботи здійснюються в двох напрямках:

1) гени, відповідальні за синтез ферментів біосинтезу певного каротиноїду, намагаються клонувати та експресувати в організми, здатні швидко рости на екологічно чистих та дешевих середовищах;

2) шляхи біосинтезу намагаються змінити в батьківському організмі таким чином, щоб перетворити його в надсинтетика каротиноїдів. Однак в обох випадках успіху перешкоджає відсутність точних відомостей про ферменти, які приймають участь у біосинтезі певних каротиноїдів [8].

Серед нових напрямків біотехнології каротиноїдних сполук слід зазначити головні [12]:

1. Інтенсифікація біосинтезу бета-каротину у *Blakeslea trispora* зеленим світлом (1,7 В/м²) протягом 48 годин, — світло використовується не для освітлення ферментера, а для отримання спорового матеріалу, вирощеного при фотодії;

2. Блокування на певній стадії шляху біосинтезу бета-каротину за допомогою певних сполук з метою отримання попередника бета-каротину — лікопіну.

3. Отримання поряд з каротиноїдами біологічно активних сполук убіхінонової природи: коензиму Q та ін. Таким чином, майбутнє в технології отримання каротиноїдів за мукоровими грибами, тому що саме вони здатні синтезувати висококонцентровані препарати біологічно активних сполук, які мають антимуутагенну та імуномодельюючу активність та радіопротекторну дію.

Для мікробіологічного одержання каротину представляють гетероталічні гриби *Mucorales*: *Blakeslea trispora* і *Phycomyces blakesleanus* та зелена одноклітинна мікроскопічна водорість *Dunaliella salina*. Каротиноїди з *Blakeslea trispora* представлені 90 % β -каротином і 10 % - α -, γ -каротинами та лікопіном. Для глибинного культивування культури продуцента *Blakeslea trispora*

використовують рідке живильне середовище, що містить вівсяний гідролізат, 30 % глютену, який відповідає концентрації азоту 0,24 % і 2 % кукурудзяної олії, рН середовища 6,95 [11]. Запропоновано вівсяний гідролізат замінити на житній, який обробляють ферментними препаратами. Житній гідролізат в поєднанні з глютенем, забезпечує накопичення фізіологічно активної біомаси гриба. Рідке середовище для глибинного культивування продуцента β -каротину *Blakeslea trispora* забезпечує економічно обґрунтований вихід β -каротину. Ця технологія може використовуватися для промислового виробництва каротинмісткої біомаси гриба *Blakeslea trispora* [9].

Спосіб отримання каротиноїдів з використанням мікроводоростей започаткований на зміні співвідношення джерела вуглецю до азоту в культуральному середовищі в процесі культивування з додаванням цитратів і ацетатів, це дозволяє підвищити вихід каротиноїдів [12].

Існує спосіб культивування гриба *Blakeslea trispora* для мікробіологічного виробництва β -каротину. Склад живильного середовища, в якості органічного джерела азоту пропонується застосовувати ячмінне борошно, гречане борошно, соєве борошно, кукурудзяний екстракт, масова частка компонентів доволі велика і складається від 4,0 до 8,0%. Обов'язковим компонентом середовища є рослинна олія (3,0-6,0 мас.%) [8]. Недоліки цих способів складаються у тому, що для культивування мікроскопічних грибів і мікроводоростей використовують складні багатокомпонентні живильні середовища. Не приділяють уваги підготовці посівного матеріалу. Обраний спосіб стимулювання синтезу β -каротину з допомогою внесення пероксиду водню в культуру гриба *Blakeslea trispora*. Спосіб отримання біомаси каротиносинтезуючих мікроорганізмів внесення в культуру пероксиду водню, відрізняється тим, що культивування мікроорганізмів здійснюють шляхом послідовних пересівань в кількості не менше 8-10 пасажів при концентрації пероксиду водню в ферментаційному середовищі 5,0-6,5 г/л, внесеного на 24-27 годин культивування, з витримкою не менше 2 годин, в якості каротинсинтезуючого мікроорганізму використовують дріжджі *Rhodotorula glutinis* ВКПМ Y-608 [13].

Для отримання каротиноїдів використовують дріжджі *Rhodotorula gracilis*, *R. rubra*, *Rhodospiridium diobovatum*, а також актиноміцети (*A. chrestomycetes* var. *aurantioideus*, *A. chrysomallus* var. *carotinoides*), мікобактерії (*Mycobacterium phlei*, *M. carotenum*), гриби (*Mucoraceae*, *Dacrymycetaceae* і ін.).

В якості екстрагентів для вилучення каротиноїдів найчастіше використовують ацетон, метанол, далі каротиноїди переводять у петролейний ефір або гексан. Останнім часом для харчової промисловості застосовують безпечніші розчинники: етиловий спирт, етилацетат, ізопропіловий спирт або їх суміші [14].

Для екстракції каротиноїдів при кімнатній температурі етиловим спиртом є 2 години, оскільки за наступну годину вилучається лише 20 % β -каротину від отриманого раніше, тобто витрачений час і втрати розчинника значно більші, ніж кількість вилученого β -каротину [15,16].

Для отримання β -каротину за допомогою *B. trispora* використовують складні за складом середовища, наприклад кукурудзяно-соєвий, що містить рослинні масла, гас, поверхнево-активні речовини та деякі спеціальні стимулятори. З метою економії для отримання β -каротину починають застосовувати вторинні продукти відходу - кукурудзяний екстракт. В якості стимуляторів синтезу каротину використовують β -іонон, який можна замінити більш дешевою цитрусовою пульпою і цитрусовою мелясою [12,17,18].

Активаторами каротиногенезу у *B. trispora* можуть бути також α -пірролідон, ізоніазид. Додавання цих активаторів, особливо останнього, на тлі дії β -іона дозволяє значно збільшити вихід каротиноїдів. Стимулятори додаються до культури продуцента після закінчення періоду інтенсивного росту біомаси [19].

Каротиноїди ізопреноїдні сполуки, які синтезуються багатьма пігментними мікроорганізмами із родів *Aleuria*, *Blakeslea*, *Corynebacterium*, *Flexibacter*, *Fusarium*, *Halobacterium*, *Phycomyces*, *Pseudomonas*, *Rhodotorula*, *Sarcina* та ін. Всього описано майже 500 каротиноїдів [20].

З однієї молекули β -каротину при гідролізі утворюються дві молекули вітаміну А. Це відбувається, наприклад, в кишечнику людини.

Як продуценти каротиноїдів можна використовувати бактерії, дріжджі, міцеліальні гриби. Найчастіше використовують зигоміцети *Blakeslea trispora* і *Choanephora conjuncta*. При спільному культивуванні вони можуть утворювати 3-4 г каротину на 1 л середовища [13].

Поживні середовища для них досить складні і включають джерела вуглецю, азоту, вітамінів, мікроелементів і спеціальних стимуляторів. Останні доцільно вносити в культуральне середовище в кінці трифази [20].

Спочатку штами вирощують порізно, а потім - спільно при температурі 26 °C і посиленій аерації з подальшим перенесенням в основний ферментер. Умови культивування зберігаються. Тривалість ферментації - 6-7 днів. Каротиноїди вилучають ацетоном (можна будь-яким іншим полярним розчинником) і переводять у неполярний розчинник. У випадках вилучення білково-каротиноїдних комплексів використовують поверхнево-активні речовини в концентрації 1-2 %. З метою очищення і більш тонкого розділення гомологів використовуються методи хроматографії або зміни розчинників. Вітамін А₁ порівняно легко можна одержати з β-каротину при гідролізі [20].

Виділений активний біосинтетик бета-каротину *Mycobacterium phei*. Крім *M. phei* відомий також цілий ряд мікобактерій, активно синтезуючих каротиноїди. Це, перш за все, *M. stegmatis*, *M. lacticolum*, *M. brevicali*. Активними біосинтетиками каротиноїдів також являють ся бактерії видів *M. glutamicus*, *Mortirela rommaniana*, *M. roseum*, бактерії роду *Pseudomonas*, фітопатогенні мікоплазми сімейства *Mycoplasmataceae* та *Acholeplasmataceae*, актиноміцети помаранчевої групи, проактиноміцети, корінеформні бактерії та дріжджі: *A. aureomonopodiales*, *A. aur coverticillatus*, *A. chryzomallus*, *Streptomyces medilary*, *Corinebacterium poinsetiae* та ін. [18].

Великим плюсом технології з використанням нищого грибу *Blakeslea trispora* було те, що в процесі ферментації він накопичує велику кількість біомаси а також те, що цей гриб може рости на дешевих субстратах. Для біосинтезу каротиноїдів використовуються як спори, так і вегетативний міцелій “плюс” та “мінус” статевих форм гетероталічного грибу *B. trispora* [21].

Дріжджі, які здатні синтезувати каротиноїдні пігменти, становлять інтерес з біотехнологічної точки зору. Серед великої різноманітності таких дріжджів, представники лише кількох невеликих таксономічних груп були досліджені на вміст каротиноїдів. Найвідомішими продуцентами цих пігментів є: *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*), *Rhodotorula* (порядок *Sporidiobolales*), *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces*, *Sporidiobolus*, також існують деякі дані про кількість і склад каротиноїдних пігментів у представників родів *Cryptococcus* (*Tremellales*), *Cystofilobasidium*, *Dioszegia*, *Kockovaella* [15].

У дріжджів *Phaffia rhodozyma* основним каротиноїдним пігментом є астаксантин. Дріжджі роду *Rhodotorula* добре відомі як продуценти торуліну, торулородину, β -каротину і γ -каротину. Ще одними відомими продуцентами цих же чотирьох пігментів є дріжджі *Sporobolomyces*, *Sporidiobolus*. Ще одними відомими продуцентами цих же чотирьох пігментів є дріжджі *Sporobolomyces*, *Sporidiobolus*. Було виявлено, що дріжджі *Cystofilobasidium* і *Dioszegia* синтезують три основних пігменти - торулородин, торулін і β -каротин. Дріжджі роду *Rhodospiridium* як і роду *Rhodotorula* в основному відомі як продуценти торуліну, торулородину, β -каротину і γ -каротину. Але даних про кількість каротиноїдів і їх склад у біомасі цих дріжджів набагато менше, ніж у дріжджів роду *Rhodotorula* [17]. Таким чином каротиноносні дріжджі роду *Rhodospiridium* є менш дослідженими, порівняно з родом *Rhodotorula*, можливо, це пов'язано з тим, що раніше їх відносили до роду *Rhodotorula* оскільки анаморфна стадія їх життєвого циклу дуже схожа з такою у *Rhodotorula glutinis*, а статеве розмноження має свої особливості. Таким чином, найпоширенішими пігментами, які синтезують різні каротиноїдні дріжджі, є β -каротин, γ -каротин, торулін, торулородин, астаксантин.

Великий інтерес для наукових досліджень представляють червоні дріжджі, які синтезують каротиноїди. Найбільш вивченими з них і часто використовуваними для отримання пігментів (β -каротину, Торул і торулародіна) є дріжджі роду *Rhodotorula*, а найкращим продуцентом астаксантину (сильний антиоксидант) - дріжджі *Xanthophyllomyces*. Крім того, до перспективних для отримання каротиноїдів шляхом мікробіологічного синтезу відносяться дріжджі пологів

Rhodospiridium, *Cryptococcus*, *Sporobolomyces*, *Sporidiobolus*, *Stigmatomyces*. Червоні дріжджі здатні до синтезу широкого спектру каротиноїдів: α -каротин, β -каротин, γ -каротин, Торул, торулародін, астаксантин, лютеїн, зеаксантин, лікопін, фітоїн, β -криптоксантин, віолоксантін, флавоксантин, нейроспорін. Причому для певного виду дріжджів характерний свій набір каротиноїдних пігментів як в якісному, так і в кількісному співвідношенні [17].

Червоні дріжджі пологів *Rhodotorula*, *Xanthophyllomyces*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Sporobolomyces*, *Sporidiobolus*, *Stigmatomyces* є перспективними продуцентами природних каротиноїдів. Найбільш вивченими і застосовуваними в біотехнологіях отримання каротиноїдсодержащих харчових і кормових добавок, а також лікувально-профілактичних препаратів є дріжджі роду *Rhodotorula* і *Xanthophyllomyces*. В даний час підвищення синтезу таких каротиноїдів як β -каротин, Торул, торулародін і астаксантин у штамів дріжджів-продуцентів має велике значення для різних галузей промисловості [20]. Тому удосконалення вивчених культур з використанням сучасної методології селекції та генної інженерії, а також розробка нових методів отримання штамів дріжджів-гіперпродуцентів каротиноїдів.

1.2 Отримання жиророзчинного вітаміну К

Вітамін К1 (філохінон) виробляється в рослинах. Вітамін К2 (менахінон, МК) в основному синтезується бактеріями і відноситься до серії нафтохінонів, що мають змінний бічний ланцюг. Різні дослідники широко вивчали механізм утворення менахінону у *Bacillus subtilis*. Молочнокислі бактерії виробляють менахінони з виходом 29–123 мг/л МК-7, МК-8, МК-9 та МК-10 [22]. У ферментованій сої, натто, *B. subtilis* виробляє менахінони, основним компонентом є МК-7, а другорядним - МК-6. Отримали стійкий до дифеніламіну мутантний штам D2000-41 зі штаму *B. subtilis* МН-1. Статичні культури дають більшу кількість МК-7, порівняно з агітованими та аерованими культурами. Вироблення вітаміну К шляхом ферментації окари із сімома різними натто-бацилами. У той час як концентрації МК-4 залишалися незмінними під час бродіння, концентрація МК-7 помітно зростала під час бродіння [21].

Вітамін К₂ продукується *Proteobacterium* (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*), *Bacteroides* (*B. fragilis*, *B.s disiens*, *B. bivius*), *Prevotella*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Arachnia propionica* і *Veillonella parvula*. Кількість його продукції в лабораторних умовах варіабельно, в залежності від складу мікрофлори - кількісного складу *Bacteroides* і *Prevotella*. Більш 8,85 мкг/г сухої ваги, всмоктується ентероцитами тонкої кишки у вигляді змішаної міцели. Добова потреба 90-120 мкг. Необхідний для синтезу протромбіну в печінці, тому його називають фактором згортання крові. Міститься в зеленому листі рослин (каштана, сої, свіжої капусти, шпинату), в незрілих помідорах, кропиві, соснових і ялинових голках [22].

Характерною особливістю вітамінів групи К є їх здатність до окисно-відновних перетворень. При дії водню вони легко і кількісно відновлюються в безбарвні нафтогідрокінони, які під впливом кисню повітря знову окислюються в пофарбовані хінони. При відновному ацетилюванні вітаміни К утворюють діацетилдігідровітаміни. Фітохінон легко окислюється з приєднанням за подвійним зв'язком хінона атома кисню і утворенням епокісєй. Деструктивне окислювання фітохінона призводить до утворення фталєвої кислоти.

Синтез вітаміну К₁. Описано різноманітні схеми синтезу вітаміну К₁. Сутність їх полягає в конденсації 2-метил-1,4-нафтогідрокінона з фітолом або ізофітола, (можна також використовувати для конденсації фітілбромід), в присутності різних каталізаторів з подальшим окисленням продукту конденсації киснем повітря. В якості каталізаторів можуть бути використані ефірат трєхфтористого бору, хлоруксусная кислота, хлорид цинку, щавлева кислота та інші [22]. Застосування мінеральних кислот або сильних конденсують засобів ($ZnCl_2$) призводять до отримання значної кількості побічних продуктів. Найкращі результати дає використання в якості каталізатора - діацетату трєхфтористого бору. Із запропонованих методів синтезу ефективним є метод Фізера. Він полягає в конденсації при температурі 75 °С. Про 3 фітола з 2-Метте-1,4- нафтогідрокіноном в розчині діоксану в присутності щавлевої кислоти.

Дігдровітамін доочищають і окислюють до вітаміну К1. Вихід вітаміну становить 29% (на фітол).

Метод має недоліки: щавлева кислота як каталізатор менш ефективна, ніж ефіри ВF3, дігдровітамін К1 містить домішки побічних продуктів, вихід вітаміну К1 невисокий, метод синтезу є малоселективним. Більш селективним є шлях синтезу, виходячи з 2-метил-1,4- нафтогідрохінона і ізофітола в присутності каталізатора діацетату ВF3 з частковою захистом однієї гідроксигрупи [23].

Найбільш раціональним методом синтезу вітаміну К1 є спосіб, який передбачає попередню захист гідроксигруп 2-метил 1,4-нафтогідрохінона ацилюванням з подальшим виборчим гідролізом і алкилюванням моноацетата 2-метил-1,4-нафтогідрохінона ізофітола. Отриманий моноацетат гідровітаміна К1 гідролізують і окислюють киснем повітря до вітаміну К1. Цей метод дозволяє отримати вітамін К1 з виходом 55-60% на ізофітола. Цей метод знайшов застосування в США, Японії та ін. Країнах і дозволяє отримувати вітамін К1 в промислових масштабах [24].

Винахід відноситься, зокрема, до засобів збагачення харчових продуктів вітаміном К. Якщо говорити точніше, то даний винахід стосується способу збільшення кількості вітаміну К2, отриманого культивуванням, щонайменше, одного штаму молочнокислих бактерій, які продукують вітамін К2, в якому зазначений штам культивується в умовах "лежать клітин" таким чином, що кількість вітаміну К2, що продукується культурою лежать клітин, перевищує на коефіцієнт, що дорівнює, щонайменше, приблизно 1,2, кількість вітаміну К2, отримане культивуванням зазначеного штаму при стандартних умовах ферментації [20]. Крім того, даний винахід відноситься до біомаси, отриманої з культури молочнокислих бактерій, які продукують вітамін К2, описаним вище способом. Винахід відноситься також до способу продукування вітаміну К2, до способів виробництва харчових продуктів, збагачених вітаміном К2, зокрема ферментованих продуктів і / або свіжих молочних продуктів, а також до харчових продуктів, отриманих такими способами. Вітамін К - це жиророзчинний вітамін,

який зустрічається в природі в двох формах: вітамін К1 (або філлохінон) і вітамін К2 (або менахінон) [24].

Багато бактерії здатні синтезувати вітамін К2. Так, крім бактерій кишкової флори і особливо таких їх видів, як *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* і *Bacteroides spp*, прикладами можуть служити деякі види або підвиди молочнокислих бактерій, такі як *Lactococcus lactis spp. lactis*, *L. lactis spp. cremoris*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* і *Propionibacterium sp*. Кількість вітаміну К2, синтезованого цими бактеріями, в більшості випадків коливається приблизно від 29 мкг до 90 мкг/л ферментованого молока [25].

Відповідно до першого аспекту, даний винахід відноситься до способу збільшення кількості вітаміну К2, отриманого культивуванням, щонайменше, одного штаму молочнокислих бактерій, які продукують вітамін К2, в якому зазначений штам культивується в умовах лежать клітин і який включає, щонайменше: інокують придатною для цієї мети культурального середовища живими бактеріальними клітинами в кількості приблизно від 108 КУО / мл до 10¹¹ КУО/мл, і ферментацію інокульованої, як зазначено вище, середовища протягом приблизно від 4 год до 48 год, переважно - приблизно від 8 ч до 48 ч, при температурі приблизно від 4 ° С до 50 ° С, переважно - при температурі приблизно від 4 ° С до 40 ° С, таким чином, що в кінці стадії кількість вітаміну К2, продукувати культурою лежать клітин, перевищує на коефіцієнт, що дорівнює, щонайменше, приблизно 1,2, кількість вітаміну К2, отримане культивуванням зазначеного штаму при стандартних умовах ферментації [26].

Переважно рівень продукування вітаміну К2, який досягається із застосуванням засобів винаходи, складає близько 30 мкг вітаміну К2/100 г ферментованого молока при стандартних умовах ферментації. У кращому випадку рівень продукування може досягати приблизно 40 мкг вітаміну К2/100 г ферментованого молока, більш переважно він може досягати або навіть перевищувати приблизно 45 мкг або 50 мкг вітаміну К2/100 г ферментованого молока. Так, кращими, зокрема, є рівні продукування приблизно 55 мкг, приблизно 60 мкг, приблизно 65 мкг, приблизно 70 мкг або приблизно 75 мкг вітаміну К2/100

г ферментованого молока або навіть вище [27]. Відповідно до одного з варіантів втілення винаходу штам молочнокислих бактерій, які продукують вітамін К₂, який використовується в способі винаходу, вибирається з роду *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* і *Propionibacterium*. Зокрема, штам молочнокислих бактерій вибирається з видів *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc lactis*, *L. pseudomesenteroides*, *L. mesenteroides*, *L. dextranicum*, *Enterococcus faecium* і *Propionibacterium sp.* Переважно штам молочнокислих бактерій вибирається з природних варіантів *Lactococcus lactis subsp. cremoris*-продуцента вітаміну К₂, які були отримані авторами винаходу в ході проведеної ними роботи [28,29].

Даного винаходу стосується способу продукування вітаміну К₂, який включає, щонайменше: здійснення способу збільшення кількості вітаміну К₂, одержуваного культивуванням, щонайменше, одного штаму молочнокислих бактерій, які продукують вітамін К₂, відповідно до попереднього описом і витяг отриманого таким способом вітаміну К₂. Згідно з п'ятим аспектом даний винахід відноситься до способів виробництва харчового продукту, збагаченого вітаміном К₂, або до способів збагачення харчового продукту вітаміном К₂ [28].

Найбільш поширені способи отримання вітаміну К₃ засновані на окисленні чистого 2 метилнафталіну (2-МН) різними окислювачами в присутності каталізаторів і без них. У промисловості вітамін К₃ отримують головним чином шляхом стехіометрического окислення 2 МН солями шестивалентного хрому з виходом 40- 50%. Невисокий вихід обумовлений утворенням крім цільового продукту ще ізомери 6 метил-1,4-нафтохінону, продуктів окислення метильної групи, дінафтохінона і інших продуктів більш глибокого окислення. Ряд авторів пропонують використовувати в якості сировини 2-метил-1-нафтол, його окислення до 2-метил-1,4-нафтохінону відбувається в присутності каталізаторів і без них. Однак, як правило, 2 метил-1-нафтол пропонують отримувати каталітичним метиліруванням 1-нафтола, що безумовно, ускладнює технологію виробництва [30]. У статті в якості сировини для отримання вітаміну К₃ пропонується використовувати безпосередньо метилнафталінову фракцію. Фракція була отримана ректифікацією кубових залишків, що утворюються на КХП

НТМК при виробництві «дистильованого» нафталіну, на лабораторній ректифікаційної установки ефективністю 40 т.т. Фракція відбиралася в інтервалі температур 241-245 ° С. Такий підхід значно спрощує підготовку сировини і дозволяє залучити в процес окислення не менше 70% 2-МН. Як оптимізуються параметрів брали вихід вітаміну К₃ і конверсію 2- і 1-метилнафталін. Як фактори, що впливають на параметри оптимізації, були прийняті: відношення маси окислювача до маси субстрату, відношення маси кислоти до маси окислювача, концентрація біхромату натрію, температура і час реакції. Використання метилнафталінової фракції з кубового залишку виробництва дистильованого нафталіну для отримання жиророзчинний форми вітаміну К₃ (менадіона) дозволяє скоротити витрати на сировину, залучити в процес окислення не менше 70% 2-метилнафталіну від наявного в нафталіновою фракції. Присутній в сировину 1-метилнафталін не впливає на вихід (54-57%) і якісні показники цільового продукту [32].

Метод синтезу вітаміну К, має лише одну перевагу - доступність сировини (бутадієн отримують на заводах синтетичного каучуку), але сам синтез досить складний, і вихід метінона на практично не перевищує 30-35% Аналізуючи наведені матеріали по синтезу вітамінів групи К необхідно відзначити наступне. Вітамін К, (метінон) за своєю біологічною активності не поступається вітаміну К₁ і К₂, а синтез його значно простіше, так як виключається громіздкий технологічний процес отримання фітола або нілліналоола - компонентів молекули вітаміну К₁ і К₂. Більш ефективним методом синтезу вітаміну К, є отримання його в одну стадію з 2-метилнафталіну з виходом 40-50% замість трьох стадій синтезу при отриманні вітаміну К₃ з виходом 30-35% [31].

Вітамін К є жиророзчинним вітаміном, що запасується в невеликих кількостях у печінці, він руйнується на світлі й у лужних розчинах. Під загальною назвою вітамін К поєднується більша група близьких за своїм хімічним складом й дією на організм речовин (від вітаміну К₁ до К₇) [32].

Із цієї групи найбільший інтерес представляють дві головні форми вітаміну К, що існують у природі: вітамін К₁ і вітамін К₂.

Вітамін К1 — речовина, яка синтезується в рослинах і знаходиться в листі. Вітамін К2 — речовина, яка переважно синтезується в організмі людини мікроорганізмами (сапрофітними бактеріями) у тонкому відділі кишечника, а також клітинами печінки тварин. Вітамін К можна виявити у всіх тканинах тварин [29].

Вітамін К1 (філохінони) і вітамін К2 (менахінони). Філохінони відкриті в рослинах, а менахінони синтезуються мікрофлорою кишечника. Біологічна роль вітаміну К полягає в тому, що він є коферментом γ -глутамілкарбоксилази, яка карбоксилює глутамінову кислоту (приєднує додаткову карбоксильну групу в γ -положенні) з утворенням карбоксиглутамату [32].

1.3 Особливості біотехнології жиророзчинного вітаміну D

Мікробіологічний синтез широко використовується в промисловості для отримання вітаміну D2 (ергокальциферол). Так, продуцентом ергостерину є культури дріжджів (*Candida utilis*, *Sacharomyces lambica*). Основне середовище містить джерело вуглецю і занижена кількість азоту, збагачується ацетатом натрію (активатором біосинтезу стеринів). Культивування дріжджів проводять при температурі, близькій до оптимальної для конкретного штаму, і вираженої аерації. Через 3-4 доби, в залежності від ростових характеристик і біосинтетической активності культури, клітини сепарують і піддають вакуум-висушування. Для отримання кристалічного вітаміну D2 клітини продуцента гідролізують соляною кислотою, додають етанол. Спиртовий екстракт упарюють, отримуючи «ліпідний концентрат», який обробляють розчином їдкого натрію. Ергостерину кристалізують, проводять очистку повторної перекристалізацією. Кристали розчиняють в діетиловому ефірі, обробляють УФ променями, після чого ефір відганяють, розчин вітаміну D2 концентрують і кристалізують [33].

Вітамін D3 - утворюється на шкірі під впливом ультрафіолетових променів і 7-дегідрохолестеріна; його фізіологічно-активною формою є 1,25-діоксіхолекальцеферол. Вітамін D2 - отримують при опроміненні дріжджових грибів ультрафіолетовим випромінюванням. Здійснюється фотоізомеризації провітаміну - ергостерину і 7-дегідрохолестеріна [32]. Біотехнологічний процес

отримання вітамінів групи D. У біотехнологічному виробництві, шляхом мікробіологічного синтезу отримують ергостерину - це попередник жиророзчинних вітамінів D2.

Краще підходять старі культури, так як в них більше необхідних біологічно активних речовин. Середовище для культивування: повинна містити активатор біосинтезу стеринів - ацетат натрію; повинна бути збагачена джерелом вуглецю - цукру, полісахариди, спирти та ін.; повинна містити мала кількість азоту. Так само, збільшують утворення стеріновий з'єднань: аскорбінова кислота, олеїнова кислота, перекис водню. Аерація середовища - 2%. Температура повинна відповідати температурі культивування певного виду мікроорганізму. Опис технологічного процесу отримання вітаміну D2. У фармацевтичних та медичних цілях застосовують кристалічний препарат вітаміну D2 [34]. У його виробництві використовують дріжджі, міцелліальні гриби. Їх піддають гідролізу розчином соляної кислоти (при 110 ° C), потім гідролізат обробляють етанолом (при 75-78 ° C). Далі його охолоджують (до 10-15 ° C) і фільтрують. Фільтрат упарюють до 40% вмісту сухих речовин. Осад, який містить вітамін D2, промивають, подрібнюють і двічі обробляють (при 98 ° C) триразовим об'ємом етанолу, що утворюються спиртові екстракти об'єднують і потім згущують до 70% вмісту сухих речовин. Отриманий концентрат обробляють натрію гідроксидом. Ергостерину міститься в неомилених фракції і випадає в осад при температурі 0 ° C. Далі його розчиняють в спирті або бензолі з метою додаткового очищення. Випали кристали сушать в ефірі. Чистий препарат ергостерину опромінюють УФ-променями для отримання вітаміну D2, ефір відганяють, розчин вітаміну D2 концентрують і кристалізують. Проводять також масляний концентрат вітаміну D2 [33]. Таким чином, завдяки появі такого наукового напрямку, як біотехнологія і активному використанню мікробіологічного синтезу, навчилися виробляти різні біологічно активні речовини, застосування яких дозволяє заповнювати їх дефіцит в організмі людини, створювати нові лікарські препарати.

Освоєння промислового синтезу вітамінів дозволило широко використовувати дані з'єднання для вітамінізації продуктів харчування, в

лікувальній практиці і в тваринництві. Основним способом синтезу вітаміну D2 в промисловості є виділення ергостерину (попередник) з дріжджів з подальшою його трансформацією в вітамін D2 під впливом ультрафіолетового світла. У процесі синтезу вітаміну D2 в виробничих умовах можна виділити наступні етапи: розмноження вихідної культури і накопичення інокулята, ферментація, сепарування клітин, опромінення ультрафіолетовими променями, висушування і упаковка продукту [35]. Для отримання ергостерину використовують дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis*, а також гриби роду *Aspergillus* і *Penicillium*. Зміст ергостерину в дріжджах збільшується в 2-3 рази при впливі на них рентгенівського випромінювання в дозі 50-200 кГц, що пояснюють пригніченням процесу амінування, що супроводжується підвищенням синтезу ліпідів. З метою отримання вітаміну D2 дріжджі або міцелій грибів піддають гідролізу розчином соляної кислоти при 110 °С. Отриману масу обробляють етиловим спиртом при 75-78 °С і після охолодження до 10-15 °С фільтрують. Фільтрат упарюють у вакуумі, після чого вміст в ньому сухої речовини досягає 50%. Масу, що залишилася після фільтрації, промивають, сушать, подрібнюють і двічі обробляють при 78 °С триразовим об'ємом етанолу.

Отримання ергостерину Ергостерину - (ергоста-5,7,22-тріен-3-ол) - вихідний продукт виробництва вітаміну D2 і кормових препаратів дріжджів, збагачених цим вітаміном. Вітамін D2 (ергокальциферол) утворюється при опроміненні ультрафіолетом ергостерину, який в значних кількостях синтезують бурі водорості, дріжджі, цвілеві гриби. Найбільш активні продуценти ергостерину - *Saccharomyces*, *Rhodotoryla*, *Candida* [36]. У промислових масштабах ергостерину отримують при культивуванні дріжджів і міцеліальних грибів на середовищах з надлишком цукрів при дефіциті азоту, високій температурі і хорошою аерації. Більш інтенсивно ергостерину утворюють дріжджі роду *Candida* на середовищах з вуглеводнями. При отриманні кристалічного препарату вітаміну D2 культивують цвілеві гриби (*Penicillium*, *Aspergillus*). Для отримання кормових препаратів опромінюють суспензію або сухі дріжджі (*Candida*) [36]. Опромінюють тонкий шар 5% суспензії дріжджів ультрафіолетовими лампами з довжиною хвилі 280-300 нм.

Кормові препарати дріжджів містять в 1 г АСВ 5000 Е вітаміну D2 і не менше 46% сирого білка. Для отримання кристалічного препарату вітаміну дріжджі або грибний міцелій піддають кислотному гідролізу при 110 °С. Вітамін екстрагують спиртом, фільтрують, далі фільтрат упарюють, кілька разів промивають спиртом. Спиртовий екстракт згущують до 50% концентрації сухих речовин, обмилюють лугом. Отримані кристали вітаміну очищають перекристалізацією і сушать в ефірі, відганяючи останній. Кристалічний осад розчиняють в олії. Даний препарат використовують в медичних цілях. Ергостерину є також вихідним продуктом для отримання ряду стероїдних гормонів, харчових і лікарських препаратів.

Ергостерину - це основний компонент стеринів дріжджоподібних грибів роду *Candida*, що використовують вуглеводи. Є кілька варіантів вирощування дріжджів - продуцентів ергостерину. Продуценти - це дріжджі, цвілі, особливо *Saccharomyces cerevisiae* [35]. Живильне середовище повинна містити джерела вуглецю, азоту, фосфору. Ферментація йде в аеробних умовах близько 12-20 годин. Для отримання кристалічного вітаміну D2, біомасу гідролізують, охолоджують, фільтрують, роблять спиртові екстракти, які обмилюють (обробляють лугом), кристалізують, очищають, розчиняючи в ефірі, видаляють ефір, а потім ергостерину опромінюють ультрафіолетовими променями (УФ-опромінення), так як вітамін D2 з ергостерину утворюється тільки після ультрафіолетового опромінення (УФ-опромінення).

Джерелом отримання ергостерину може служити і міцелій грибів, який залишається як відхід (побічний продукт) антибіотической промисловості. Мікроорганізми *Cryptococcus curvatus* на середовищах з відходами молочної промисловості і при переробці бавовни синтезують значні кількості ергостерину. Це все відноситься до питання рентабельності і екологічності біотехнологічного виробництва.

Мікробіологічними способом отримують і вітамін D2 (ергокальциферол), при виробництві якого освоєно дешеву сировину (вуглеводні) і встановлений стимулюючий ефект ультрафіолетових променів на синтез ергостерину культурою дріжджів [35].

Вітамін D - це група вітамінів, в тому числі холекальціфірол і ергокальцеферол. У шкірі під дією ультрафіолетових променів синтезується холекальциферол (вітамін D3) і надходить в організм людини з їжею. Ергокальциферол (вітамін D2) може надходити тільки з їжею. Головною функцією вітаміну D є забезпечення всмоктування кальцію і фосфору з продуктів харчування в тонкому кишечнику. Продуцентами даних вітамінів є дріжджі і міцеліальні гриби - аспергілли і Пеницилл [37].

Таким чином, можна сказати, що мікробіологічний синтез вітамінів все ширше включається в нові технологічні схеми. Використання досягнень в області фізіології мікроорганізмів - продуцентів БАР - дозволяє оптимізувати біосинтез і збільшувати їх вихід. Використання в промисловості зазначених методів дає можливість застосовувати більш дешеві джерела сировини, збільшувати вихід продукції, замінювати дорогі і трудомісткі стадії хімічного синтезу.

У біотехнологічному плані, зазвичай мають на увазі провітамін, ергостерин, основний стерол міститься у дріжджах та міцеліальних грибах.

В промисловості широко використовується мікробіологічний синтез отримання вітаміну D₂ (ергокальциферол). Продуцентом ергостерину є культури дріжджів *Candida utilis*, *Sacharomyces lambica* [37]. Культивування проводять при температурі оптимальній для певного штаму. Щоб отримати вітамін D₂ клітини продуцента гідролізують соляною кислотою та додають етанол. Спиртовий екстракт упарюють, отримують «ліпідний концентрат», який обробляють розчином їдкого натрію. Ергостерин кристалізують, проводять очистку повторну перекристалізацію. Кристали розчиняють в діетиловому ефірі, обробляють ультрафіолетовими променями, потім ефір відганяють, розчин вітаміну D₂ концентрують і кристалізують.

Для одержання лікарських препаратів вітаміну D₂ широко застосовується мікробіологічний синтез.

Вітамін D₃ - утворюється на шкірі під впливом ультрафіолетових променів і 7-дегідрохолестеріна. У біотехнологічному виробництві, шляхом

мікробіологічного синтезу отримують ергостерин - це попередник жиророзчинних вітамінів D2 [38].

Умовами мікробіологічного синтезу ергостерину краще підходять старі культури тому, що вони містять більше необхідних біологічно активних речовин. Середовище для культивування повинно містити малу кількість азоту, ацетат натрію, має бути збагачене джерелом вуглецю, цукру, полісахаридів, спиртів.

При виробництві вітаміну D2 використовують міцеліальні гриби гідролізують розчином соляної кислоти (при 110 °С), гідролізат потім обробляють етанолом (при 75-78 °С), і охолоджують (до 10-15 °С) та фільтрують. Фільтрат упарюють. Промивають осад, який містить вітамін D2, подрібнюють, двічі обробляють (при 98 °С) триразовим об'ємом етанолу, які утворюють спиртові екстракти об'єднують і згущують до 70% вмісту сухих речовин [39].

Отриманий концентрат обробляють натрію гідроксидом. Опромінюють УФ-променями чистий препарат ергостерину для отримання вітаміну D2.

За допомогою біотехнології і активному застосуванню мікробіологічного синтезу, виробляють різні біологічно активні речовини, застосування яких дає можливість заповнювати дефіцит в організмі людини, виготовляти нові лікарські препарати.

Виділяють етапи у процесі синтезу вітаміну D2 в виробничих умовах: ферментація, сепарування клітин, розмноження вихідної культури і накопичення інокулята, опромінення ультрафіолетовими променями, висушування і упаковка продукту. Наявність ергостеролу в різних видах пеніцилію, тобто в *P. puberulum*, *P. italicum*, *P. aurantiogriseum*, *P. brevi-compactum* та *P. citrinum*. Штами *P. notatum*, що продукують пеніцилін та *P. chrysogenum*, показано, що він містить ергостерол. Масштабних досліджень дріжджів *Aspergilli* і *Penicillia* не проводилось. Максимальний вміст ергостеролу, виявлений цими працівниками, становить 2,4% у *Saccharomyces carlsbergensis* [40]. Головним фактором, що визначає вміст ергостеролу, є цукор, ергостерол є головним продуктом метаболізму вуглеводів.

Ергостерин попередник вітаміну D2 широко використовується в різних галузях харчової промисловості та медицині. Хімічний синтез ергостеролу є

складним, багатостадійним, вимагає високих матеріальних, енерго- і трудовитрат. Промислове отримання ергостеролу в даний час здійснюється шляхом біосинтезу із застосуванням різних мікроорганізмів, рослинних клітин і мікроводоростей. Серед дріжджів найбільшого поширення для отримання ергостеролу отримали *S. cerevisiae*, *S. uvarum*, *S. carlsbergensis*, *S. ellipsoideus* [41].

У промислових умовах вітамін D2 отримують фотоізомерацією ергостерину, одержуваного з дріжджів. Стадія отримання ергостерину є лімітуючою в процесі. Особливістю винаходу знаходження таких умов сольволізу складних багатокомпонентних сумішей, при яких в розчин переходить в основному ергостерину при мінімумі продуктів, що утворюють з ним важкорозчинні комплекси, що відбувається в разі застосування стандартних, більш жорстких умов Зміна концентрації луку вище і нижче заявлених параметрів веде до пониження виходу ергостерину. Так, сольволізу 0,5% їдким калі знижує вихід до 70% в зв'язку з недостатньою глибиною протікання сольволізу, а підвищення концентрації до 5- 10% також знижує вихід цільового продукту в зв'язку з утворенням продуктів сольволізу, що зв'язують вільний ергостерину і не дозволяють виділити його з суміші [39].

Спосіб отримання ергостерину, що включає обробку липидно-жирового концентрату відходу виробництва харчових і кормових продуктів з дріжджів - спиртової лугом і виділення цільового продукту кристалізацією, що відрізняється тим, що обробку липидно-жирового концентрату проводять 1 2% -ним розчином їдкого калі при співвідношенні ліпідний концентрат спиртовий розчин луку не менше 1 12 за умови кип'ятіння не менше 1 години.

Вітамін D3 - утворюється на шкірі під впливом ультрафіолетових променів (далі УФ-промені) і 7-дегідрохолестеріна; його фізіологічно-активною формою є 1,25-діоксіхолекальцеферол [38].

Вітамін D2 - отримують при опроміненні дріжджових грибів ультрафіолетовим випромінюванням (далі УФ-випромінювання). Здійснюється фотоізомеризації провітаміну - ергостерину і 7-дегідрохолестеріна.

У біотехнологічному виробництві, шляхом мікробіологічного синтезу отримують ергостерину - це попередник жиророзчинних вітамінів D2.

До продуцентів ергостерину відносяться такі мікроорганізми, як:

1. *Saccharomyces cerevisiae* (пекарські дріжджі);
2. *Saccharomyces carlsbergensis* (пивні дріжджі);
3. *Penicillium notatum* (пеницил золотистий);
4. *Aspergillus niger* (аспергил чорний);
5. *Rhodotorula glutinis* (родоторула клейка);
6. *Candida utilis*, *Candida tropicalis* (представники роду кандиди).

Технологічна схема отримання ергостерину:

1. Вирощування біомаси на живильному середовищі, накопичення інокулята;
2. Ферментація;
3. Поділ біомаси та культуральної рідини (сепарація);
4. Витяг і очищення діючої речовини;
5. Висушування продукту;
6. Опромінення УФ-променями;
7. Виготовлення лікарського препарату.

Умови мікробіологічного синтезу ергостерину.

Краще підходять старі культури, так як в них більше необхідних біологічно активних речовин. Середовище для культивування: повинна містити активатор біосинтезу стеринів - ацетат натрію; повинна бути збагачена джерелом вуглецю - цукру, полісахариди, спирти та ін.; повинна містити мала кількість азоту [39]. Так само, збільшують утворення стеаринових з'єднань: аскорбінова кислота, олеїнова кислота, перекис водню. Аерація середовища - 2%. Температура повинна відповідати температурі культивування певного виду мікроорганізму

У фармацевтичних та медичних цілях застосовують кристалічний препарат вітаміну D2. У його виробництві використовують дріжджі, міцелліальні гриби. Їх піддають гідролізу розчином соляної кислоти (при 110 °С), потім гідролізат обробляють етанолом (при 75-78 °С). Далі його охолоджують (до 10-15 °С) і

фільтрують [43]. Фільтрат упарюють до 40% вмісту сухих речовин. Осад, який містить вітамін D₂, промивають, подрібнюють і двічі обробляють (при 98 °С) триразовим об'ємом етанолу, що утворюються спиртові екстракти об'єднують і потім згущують до 70% вмісту сухих речовин. Отриманий концентрат обробляють натрію гідроксидом. Ергостерину міститься в непомиленій фракції і випадає в осад при температурі 0 °С. Далі його розчиняють в спирті або бензолі з метою додаткового очищення. Випали кристали сушать в ефірі. Чистий препарат ергостерину опромінюють УФ-променями для отримання вітаміну D₂, ефір відганяють, розчин вітаміну D₂ концентрують і кристалізують. Проводять також масляний концентрат вітаміну D₂ [42].

РОЗДІЛ 2

ТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ ВІТАМІНУ ГРУПИ А

2.1. Біотехнологічні аспекти виробництва β -каротину

Каротиноїди - найбільш численна і поширена група природних жиророзчинних пігментів. Каротиноїди синтезують вищі рослини, водорості і деякі лишайники, а також бактерії і міцеліальні гриби [50]. Засвоєння каротиноїдів відбувається в тонкому кишечнику, де пігменти можуть або окислюватися, або метаболізуватися (наприклад, β -каротин в вітамін А) [46]. Засвоєння каротиноїдів в організмі людини без біотрансформації призводить до включення пігментів до складу ліпопротеїнів, після чого вони транспортуються в жирову тканину, печінку, надниркові залози, яєчники та інші органи [51].

В даний час, виявлено і вивчено понад 700 різних каротиноїдів [8,9]. Ці пігменти в природі зустрічаються в різній формі: у вигляді ефірів довго ланцюжкових жирних кислот, наприклад, в хроматофорах і епідермальних структурах рослин, у вільній формі - в пластидах рослин, м'язової тканини риб, яйцях птахів, а також можуть входити до складу каротин-білкових комплексів - в епідермальних тканинах тварин і т.д. [51].

Найбільш перспективним джерелом каротину для біотехнологічної промисловості визнана зелена водорість *D. salina* [44]. Відомо, що за певних умов вона здатна до гіперсинтезу каротину, вміст якого в її клітинах може досягати 10 %. Джерелом пігментів можуть бути і синьо-зелені водорості.

Каротиноїди продукуються також дріжджами роду *Rhodotorulla*, *Sporobolomyces* та ін. Каротиноїди містяться в хлоропластах водоростей *Euglena*, *Ulva*, *Cyanophyta*, *Chlorella*, *Sconodesmus*, *Dunaliella salina*.

Вихід бета-каротину з використанням *Dunaliella salina* сягає 14 %

					НУХТ БТЕК 06.01.03 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Ірклієнко Н.П.			РОЗДІЛ 2 ТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ ВІТАМІНУ ГРУПИ А	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Стабніков В.П.					30	90
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Водорості вирощують у великих водоймищах, поблизу солоних озер в місцях з високою сонячною активністю. Для збагачення водорості каротином використовують дуже цікавий захід — різко збільшують концентрацію солі у воді. Біомаса містить (в 1 кг) до 30 г каротину, 400 г гліцерину, велику кількість білку. На основі біомаси *Dunaliella salina* були відпрацьовані технології виробництва вітамінних концентратів з різним вмістом каротиноїдів [45].

Були вказані спеціальні умови вирощування муковорих каротинсинтезуючих грибів, зокрема *B. trispora*, методом глибинного культивування при певних співвідношеннях міцелію різних статевих форм. Введення в культуральну рідину або в поживне середовище для ферментації альфа- та бета-іононів або інших терпеноїдів значно стимулює біосинтез бета-каротину. А використання антиоксидантів, таких як іонол, сантохін, агідол та ін., попереджає процеси перекисного окислення каротиноїдів при висушуванні та зберіганні каротиномісткої біомаси.

Бета-каротин - цінною продуктом для збагачення харчових продуктів, отримання вітамінних та лікарських препаратів, призначених для підвищення захисних функцій організму, лікування захворювань шлунково-кишкового тракту, опіків, пролежнів, трофічних виразок та ін. [46]. А також використовується в якості добавки в корм тварин. Відомий спосіб отримання бета-каротину, який передбачає отримання бета-каротину шляхом конденсації ретинілтрифенілфосфонової солі, отриманої з ретинілацетата і трифенілфосфіна з ретиналь в спирті, в присутності їдкого лугу, при цьому ретиналтрифенілфосфонієву сіль вводять у вигляді гідросульфату, а ретиналь - у вигляді гідроксинонову комплексу при співвідношенні ретинілацетата і їдкого лугу.

Провітамін А - каротину належить провідна роль в окисновідновлювальних реакціях організму. Каротин впливає на обмін і синтез білка, при його нестачі порушується використання азоту корму, що веде до зниження синтезу білкових речовин. Співробітниками інституту розроблена безвідходна біотехнологія переробки зернової барди в сухі кормові дріжджі. Використовують всю зернову барду спиртового заводу, що дає можливість

отримати високобілковий, збагачений β -каротином кормовий продукт і повністю вирішити проблему промислової переробки барди. Що використовується у виробництві непатогенних штамів кормових дріжджів *Rhodospiridium diobovatum* 115, продукує не тільки білок, але і β -каротин, асимілюючи з'єднання барди, що не представляють кормової цінності. Проведення спрямованого біосинтезу кормових дріжджів дозволяє отримати кормовий продукт з вмістом β -каротину більше 60 мг/кг (до 180 мг/кг).

Для висушування дріжджової суспензії використовується розпилювальна сушарка, як сушильного агента - природний газ. Проведені дослідження показали, що 1 г сухої речовини біомаси кормових дріжджів, збагачених β -каротином містить, мкг: • тіаміну (B1) - від 31,0 до 75,3; • рибофлавіну (B2) - від 7,5 до 15,0; • нікотинової кислоти (B5) - від 657,9 до 842,1; • піридоксину (B6) від 10,5 до 21,1; • біотину (B7) - від 0,52 до 1,32.

Каротиноїди промислового біотехнологічного препарату з *B. trispora* представлені на 90 % β -каротином і на 10 % - α -, γ -каротинами та лікопіном. Чистота препарату, що досягається внаслідок екстракції та очищення культурального середовища, має бути не менше 90%. Домішки, що складають до 10% готового продукту, представлені іншими представниками групи каротиноїдів та низькомолекулярними органічними сполуками.

Виділення цільового продукту вітаміну (каротину) значно відрізняється в залежності від того, накопичується продукт в клітині або він виділяється в культуральну рідину, або ж продуктом є сама клітинна маса. Клітини необхідно відокремити від культуральної рідини, зруйнувати (дезінтегрувати) і далі цільовий продукт відчистити від маси компонентів зруйнованих клітин. Виділення продукту полегшується, якщо він вивільняється продуцентом культуральної рідини.

Каротиноїдний пігмент видаляли з клітин шляхом екстракції з абсолютним етанолом. Екстракцію β -каротину проводили в інкубаторі з обертовим шейкером при 300 об/хв протягом 2 год і при температурі, що була оптимальною для кожного розчинника. Після 2 год екстракції, рідину центрифугували при 5000 г протягом 20 хв., супернатант видаляли, осад екстрагували свіжим розчинником. Виділенні

повторюється чотири рази. Найбільша кількість каротиноїдного пігменту, що виділяється з клітини отримували за допомогою методу, при якому ферментаційний бульйон пропарювався при 121 °С протягом 15 хв, а β-каротин видалявся безпосередньо з клітин шляхом екстракції етанолом без висушування біомаси. Максимальна кількість видалення β-каротину з клітин отримується екстракцією етанолом.

Концентрація 100% етанолу і співвідношення біомаси до розчинника 1:100 дало максимальну кількість β-каротину, вилученого з клітини.

В лабораторних та промислових умовах каротин отримують наступним шляхом:

1. По закінченню виробничого культивування рідину нагрівають до 120 °С на 15 хв;
2. Культуральну рідину екстрагують етанолом;
3. Для відділення клітин від культуральної рідини використовують центрифугування при 3000 об/хв протягом 10 хвилин на центрифугі Т-23;
4. Промивання екстракту водою;
5. Проводять упарювання розчину для видалення залишків органічних розчинників та кристалізації каротину, охолодження;
6. Промивання етилацетатом, для осадження бетакаротину;
7. Сушка розпилювальна для досягнення чистоти 90-95%.

Технологія виробництва β-каротину складається із наступних принципових стадій: підготовка посівного матеріалу; підготовка поживного середовища, виробничий біосинтез; виділення та очистка β-каротину. Докладніше дані процеси представлені у графічній частині дипломної роботи на технологічній схемі виробництва β-каротину шляхом мікробного синтезу культурою *V. Trispora* штами К2 (+) та К2 (-). Апаратурне оформлення процесів представлено у графічній частині дипломної роботи на апаратурній схемі виробництва β-каротину [46].

В останні десятиліття в якості джерела природного β-каротину розглядається дуналієлла солоноводная (*Dunaliella salina* Teod.). Цей вид одноклітинних зелених водоростей, що мешкають переважно в гіперсолених

водоймах, відомий своєю здатністю накопичувати від 0,5 до 10% β -каротину на суху речовину. β -каротин *D. salina* має високу біологічну активність завдяки ізомерний складу, якого неможливо досягти шляхом хімічного синтезу. Запас каротиноїдів в солесадочних басейнах досягає 38 кг/га [47].

Біосинтез каротиноїдів у дріжджових грибів починається в пізньому логарифмічній фазі і триває в стаціонарній фазі, і включає в себе три основних етапи: 1. Синтез каротиноїдів починається з перетворення ацетил-КоА в 3-гідрокси-3-метилглутарил. Каталізатором цієї реакції виступає НМГ-СоА-синтаза. Потім, НМГ-СоА під дією специфічної редуктази перетворюється в мевалонову кислоту. Мевалонік кислота фосфорилується фосфомевалонаткіназой і декарбоксилюється мевалонат-5-пірофосфатдекарбоксилазой з утворенням ізопентіл-5-пірофосфату. 2. IPP ізомеризується (фермент - ізопентілпірофосфат ізомерази) в диметілалілпірофосфат з додаванням трьох молекул. Під дією ферменту пренілтрансферази перетворюється в геранілгеранілпірофосфат, який містить 20 атомів вуглецю. Конденсація двох молекул GGPP каталізується фітоінсінтазой і супроводжується утворенням фіто (містить 40 атомів вуглецю). Далі в результаті дії фіто-десатурази утворюється нейроспорін. Нейроспорін може бути трансформований в лікопін. Останній може утворюватися в клітці або через присутність інгібіторів, або за рахунок стрес-факторів навколишнього середовища. 3. В результаті циклізації лікопіну або дегідрірованія β -зеакаротіна утворюється γ -каротин [43]. У свою чергу, β -каротин - в результаті циклізації γ -каротину (каталізатор - β -лікопенціклаза). Знаходячись під різним реакціям, з лікопіну утворюються інші каротиноїди: астаксантин, Торул, торулародін і т.д. Такі каротиноїди як β -каротин, лютеїн, астаксантин, а також Торул і торулародін мають велике промислове значення за рахунок їх широкого застосування і наявності яскраво виражених антиоксидантних властивостей. Тому з економічної точки зору широкомасштабне промислове виробництво біопрепаратів цих каротиноїдів найдоцільніше [53].

Штаму дріжджів *Rhodosporidium diobovatum* ВКПМ Y-3159 здатний продукувати каротиноїдів до 6,5 мг/г сухої біомаси, в тому числі β-каротину до 4,5 мг/г. У ферментері на глюкозі в якості єдиного джерела вуглецю штам здатний накопичувати більше 100 г сухої біомаси з 1 л живильного середовища. Штам зберігається в 10% гліцерині при - 70 ° С в кельвінаторе або парах рідкого азоту без втрати життєздатності протягом 10 років. Культивування штаму *Rhodosporidium diobovatum* ВКПМ Y - 3159 в колбах [49]. Штам дріжджів культивують в колбах на 750 мл при температурі 28 ° С при 250 об/хв на живильному середовищі наступного складу (мас.%): Глюкоза - 10,0; дріжджовий екстракт - 0,6; пептони - 0,5; КН₂РО₄ - 0,1; MgSO₄ - 0,05, NaCl - 0,01; СаCl₂ - 0,01; вода - інше. Час вирощування 72 ч. Питомий сумарний вміст каротиноїдів визначають спектрофотометричним методом, для визначення процентного співвідношення каротиноїдів в суміші використовують рідинну хроматографічну систему HPLC, застосовуючи в якості стандарту чистий кристалічний препарат β-каротину фірми "Sigma". Питома продуктивність каротиноїдів становить 6000 мкг/г сухої біомаси, в тому числі β-каротину 4440 мкг/г сухої біомаси [51].

В останній час відновився інтерес до вироблення екологічно чистих каротиноїдів шляхом їх мікробіологічного синтезу. Промислові біотехнологічні методи виробництва каротиноїдів були розроблені на основі водоростей *Dunaliella* і *Haematococcus Pluvialis*, дріжджів *Xanthophyllomyces dendrorhous*, мікроскопічних грибків *Blakeslea trispora* та інші [49]. Перевагою біотехнологічних методів є направлений синтез каротиноїдів: створення штамів мікроорганізмів, що продукують окремі терпеноїди – β-каротин, торулін, астаксантин, лікопін та інш.; використання спеціальних поживних середовищ для культивування, які змінюють характер метаболізму та вироблення пігментів [55]. Дослідження біомаси мікроскопічного мукорового гриба *B. trispora*, який культивували на експериментальному безглюкозному поживному середовищі насиченому неорганічними амонійними солями, як єдиним джерелом азотного живлення, встановило наявність каротиноїдів до 20, 9 г/кг (у моркві 72 мг/кг), аскорбінової кислоти – 674,0 мг/кг, мікроелементів – 261,8 мг/кг, есенційної амінокислоти

метіоніну - 40,9 г/кг. Таким чином, біотехнологічний синтез каротиноїдів є перспективним джерелом цих пігментів, а також інших незамінних компонентів харчування [52].

Каротиноїди синтезуються в клітинах бактерій, мікроводоростей, грибів та вищих рослин. Інтенсивність синтезу і розпаду каротиноїдів залежить від біології виду, стадій розвитку й умов культивування. Каротиноїди проявляють антиоксидантні властивості, є попередниками жиророзчинних вітамінів у клітинах тварин, беруть участь у процесі фотосинтезу в рослинах і їх отримання становить великий науковий і комерційний інтерес [54,55].

РОЗДІЛ 3

ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИПУСКУ β -КАРОТИНУ

3.1. Потреба у β -каротині

Каротиноїди – стійкі до зміни рН, температур і витримують нагрівання (без втрат кольоровості до 130°C), вони є відновниками і при введенні в систему антиоксидантів типу аскорбінової кислоти та, токоферолу значно збільшують свою стабільність. На сьогоднішній день найбільш прогресивною технологією отримання β -каротину є мікробіологічний синтез [57].

Бета-каротин має високу біологічну активність. Як сильний антиоксидант, бета-каротин виконує різні функції в нашому організмі: він захищає від вільних радикалів, підвищує стресостійкість, допомагає організму швидше адаптуватися в незвичних і складних умовах, пом'якшує вплив радіації, електромагнітних і хімічних забруднень, зміцнює імунітет і підвищує здатність організму опиратися інфекціям. Особливої актуальності на сьогодні набуває профілактика оксидативного стресу за допомогою функціонального харчування [57].

Оксидативним стресом вважають порушення обміну речовин та енергії, накопичення активних пошкоджуючих агентів, що ініціюють пошкодження клітин і призводять до розвитку різних патологічних станів. Серед негативних наслідків - пошкодження органів і систем, зокрема мозку, серця, легенів, печінки, нирок, шлунково-кишкового тракту, шкіри і т.п. Окислення сповільнюється завдяки речовин, що руйнують діалкілсульфіди (перекис водню). До них також належать каротиноїди, поліфеноли: флавоноїди, таніни, антоціани. Саме ці речовини є прекрасними барвниками і фізіологічно активними речовинами для використання в харчовій промисловості [57].

Натуральні каротини, в тому числі і бета-каротин, для забарвлення харчових продуктів використовуються в основному, в молочній, олієжировій,

					<i>НУХТ БТЕК 06.01.03 КР ПЗ</i>					
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>						
<i>Розроб.</i>		<i>Ірклієнко Н.П.</i>			РОЗДІЛ 3 ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИПУСКУ β-КАРОТИНУ					
<i>Перевір.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Реценз.</i>									37	90
<i>Н. Контр.</i>								<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>								

кондитерській, хлібобулочній і м'ясопереробній промисловості, виробництві безалкогольних напоїв, а також в якості біологічно активних добавок і для вітамінізації, у виробництві цільових продуктів харчування і для забарвлення фармацевтичних препаратів і косметичних продуктів [57].

У виробництві харчових продуктів бета-каротин частіше застосовується не у чистому вигляді, а у вигляді товарних форм: олієрозчинних препаратів – масляних розчинів (концентрацією 0,1 і 0,2, 1,0, 2 %), жирової суспензії (концентрацією 10-30 %), дисперговані у воді препарати з тією ж концентрацією, що і олієрозчинні препарати і суспензії, а також у вигляді кристалічного порошку (мікробіологічний і синтетичний) і водорозчинного порошку (синтетичний), який містить не менше 96 % бета-каротину [57].

Препарати бета-каротину сприяли відновленню імунного статусу у дітей із екологічно несприятливих районів, їх успішно застосовували з метою імунореабілітації дорослих хворих [58].

Додавання бета-каротину в раціони хворих з множинними травмами, опіками, ранами, пацієнтів, які страждають на остеїти, гострі респіраторні захворювання, діареї, призводило до поліпшення загального стану та прискорення їх лікування. Використання бета-каротину для лікування хворих, які страждають на виразкову хворобу шлунка і 12-палої кишки, ерозії гастродуоденальної зони, призводило до вираженого клінічного ефекту, що супроводжується в 90% випадків клінікоендоскопічною ремісією протягом 5 років вивчення [58].

Щоденний прийом протягом 2-3 тижнів хворими на виразкову хворобу дванадцятипалої кишки та ерозивний гастрит 18 мг бета-каротину щодня підвищив його концентрацію в сироватці крові обстежуваних у середньому в три рази, прийом бетакаротину не супроводжувався підвищенням концентрації ретинолу в застосування. Прийом каротину сприяв підвищенню антиоксидантного статусу обстежуваних, що виявилось у збільшенні резистентності еритроцитів до перекисного гідролізу та зниження концентрації малонового альдегіду в сироватці крові. Прийом каротину сприяв усунуванню больового синдрому у хворих на

виразкову хворобу, рубцювання виразок та зникнення ерозій слизової оболонки шлунка [58].

Перспективним виявилось застосування бета-каротину у ветеринарії та тваринництві. Використання кормової добавки для збалансування А-вітамінного харчування може бути серйозним інструментом у зниженні негативного впливу на організм тварини факторів навколишнього середовища та стресу, що необхідно для реалізації більшості життєво важливих функцій організму. Позитивні результати отримані при лікуванні ендометріозу, що дозволило розробити стерильний ін'єкційний препарат каролін для лікування та профілактики акушерсько-гінекологічних патологій у тварин [58,59].

Наприклад, бета-каротин введений у раціон підсмоктуючим свиноматкам впливає їх багатоплідність, великоплідність і життєстійкість приплоду, тобто фактично на їх продуктивність. На думку багатьох авторів, каротин у свиней у шлунково-кишковому тракті всмоктується тільки у трансформованому вітаміні А вигляді, і тому в крові його не виявляють. За результатами досліджень сироваток крові, отриманих від свиноматок, яким згодовували кормову добавку, чітко виражена тенденція збільшення рівня каротину в порівнянні з аналогами з контрольної групи, що вказує на здатність бета-каротину всмоктуватися зі шлунково-кишкового тракту як у чистому, так і в трансформованому вигляді у вітаміні А [59].

При нестачі вітаміну А порушується біосинтез сироваткових альбумінів у сироватці крові та знижується відношення альбумінів до глобулінів. Нестача вітаміну А в раціонах призводить до зниження в організмі рівня цинку та активності цинквмісних ферментів, що сприяє виникненню паракератозу у свиней. Таким чином, для підвищення імунної реактивності організму необхідно вводити в раціон тварин каротин і вітаміні А, а також застосовувати вітамінні та каротинвмісні препарати [60].

Відтворювальна здатність биків залежить від годівлі, яке контролюють з урахуванням їхньої живої маси, вгодованості, віку та інтенсивності використання. Дефіцит вітаміну А веде до порушення діяльності спермоутворюючої тканини

насінника та залізистої тканини придатка насінника, що в свою чергу може призвести до повного припинення спермоутворення, а також до неповноцінного визрівання сперміїв, порушення збереження сперміїв у насінниках і, як результат, отримання сперми низької якості. Заповнити нестачу вітаміну А можна введенням каротину разом з кормом, оскільки саме каротин є попередником вітаміну А. До того ж каротин не може синтезуватися в організмі, а надходить виключно з рослинними кормами [61].

При нестачі в організмі корів β -каротину спостерігаються такі порушення репродуктивної функції, як затяжна овуляція, недостатньо розвинене жовте тіло яєчника, що тягне за собою підвищення рівня ембріональної смертності, збій статевої циклічності, формування фолікулярних кіст яєчників, збільшення на 18-20-му тижні тільності, зниження життєздатності новонароджених телят. Внутрішньом'язове введення β -каротину коровам у зимовий період перед заплідненням дозволяє підвищити результативність на 15–20,7% як у спонтанну, так і в індуковану тічку. Це зумовлено впливом β -каротину на функціональну активність жовтого тіла, забезпечує адекватний рівень прогестерону, який у свою чергу сприятливо впливає на розвиток та імплантацію ембріона [62].

Окрім того, потреба у вітаміні А визначено й в коней. Конярство в Україні завжди було галуззю загально державного значення, функціональна спрямованість якої змінювалась в залежності від розвитку соціально-економічних відносин. В умовах реформування агропромислового комплексу та з переходом до ринкової економіки, розвиток конярства сприятиме вирішенню важливих виробничих, економічних і соціальних питань [63].

Нині роль і значення коней у народному господарстві держави має комплексний характер. Племінних коней використовують для поліпшення існуючих та створення нових, більш досконалих порід, які б відповідали вимогам європейських і світових стандартів. Використовують як тяглову силу у колективних, приватних і фермерських господарствах, для перевезень вантажів під час заготівлі кормів, обслуговуванні тваринницьких ферм, роз'їздів по догляду за масивами лісів та інше [63].

Конярство – специфічна галузь тваринництва, основний напрям якого в сучасних умовах – спорт, хобі, дозвілля людини, лікування (іпотерапія), обробка невеликих садиб з метою виробництва екологічно чистої продукції рослинництва. Найбільш знаваною сферою є саме кінний спорт. Саме ця сфера висвітлює потребу коней у якісній вигодівлі, а також показує потребу у вітаміні А. При нормуванні годівлі спортивних коней необхідно враховувати, що спортивна робота коня підвищує потребу в енергії, вітамінах і кухонній солі. У період тренінгу й випробувань потреба в енергії підвищується на 32 %, у протеїні та лізині – на 13 %, у мінеральних речовинах – на 12%, у тому числі в кухонній солі – на 80 %, у вітаміні А – на 85 %, D – на 66 %, E – на 37 %, групи В – на 15-80 % у порівнянні з кіньми, що знаходяться на відпочинку [64,65].

В таблиці 3.1. вказано потребу різним групам тварин у вітаміні А та у бета-каротині.

Таблиця 3.1

Норми потреби у вітаміні А та його попереднику – бета-каротину [66]

Вітаміни на 1 кг готового корму		
Група тварин	Вітамін А	Бета-каротин
	М.Е.	мг
Курчата стартер	12000-16000	-
Курчата/молодняк	8000-10000	-
Кури-несучки	8000-12000	-
Бройлери (відкорм)		-
Індики (відкорм)		-
Поросята	10000-16000	-
Свині на відкормі	5000-10000	-
Свиноматки	5000-15000	200-400
Вітаміни на 1 голову в день		
Коні	30000-60000	300
Велика рогата худоба (ремонтний молодняк)	30000-50000	-
Велика рогата худоба на відкормі	40000-70000	-
Дойні корови	80000-150000	200-400
Вівці/кози	4000-8000	-

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Станом на 2020 р в Україні наліковується 224 тис. голів коней. Зважаючи на це, забезпечувати будемо 30% від загальної кількості. Отже, кількість коней, на яку буде виготовлятися превітамін становить:

$$224\ 000 \times 0,3 = 22\ 400$$

Як вже було зазначено вище, необхідна кількість бета-каротину на одну голову в день становить 300 мг. Отже, кількість, яка необхідна одній голові в рік становить:

$$365 \times 300 = 109\ 500 \text{ мг} = 109,5 \text{ г} = 0,1095 \text{ кг}$$

Кількість бета-каротину, яка необхідна для забезпечення потреб 30% коней становить:

$$22\ 400 \times 0,1095 = 2\ 452,8 \text{ кг}$$

Отже, кількість культуральної рідини на рік становить:

$$\frac{2\ 452,8}{6,3} = 389,3 \text{ м}^3$$

Узагальнена інформація зазначена в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2

Узагальнена інформація

Продукт мікробного синтезу	Кількість коней в Україні	Кількість коней, яку будемо забезпечувати	Необхідна кількість бета-каротину на рік	Кількість культуральної рідини на рік
Бета-каротин	224 000	67 200	7 358,4 кг	1 168 м ³

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Приймаємо, що для отримання 389,3 м³ культуральної рідини необхідно 330 робочих трудоднів (T_{рд}). Відповідно кількість культуральної рідини на добу (V_д) становитиме:

$$V_d = V_{кр} / T_{рд} = 389,3 / 330 \approx 1,2 \text{ м}^3$$

Розрахуємо кількість культуральної рідини за один цикл, (V_{крц}):

$$V_{крц} = K_1 \cdot V_d \cdot T_{цф} / 24 = 1,1 \cdot 1,2 \cdot 103 / 24 \approx 5,7 \text{ м}^3,$$

де $T_{\text{цф}}$ - цикл роботи ферментера, який включає: мийку та огляд – 1,5 год, перевірку на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізацію апарату – 1,5 год, охолодження ферментеру – 1 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год, ферментацію – 96 год, та вивантаження – 0,5 год, і становить 103 години. K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1$).

Геометричний об'єм ферментера для отримання $5,7 \text{ м}^3$ культуральної рідини, з коефіцієнтом заповнення 0,6 (ферментер без аерації) має становити:

$$V_{\Gamma} = V_{\text{цк}}/K_{\text{зап}} = 5,7/0,6 \approx 9,5 \text{ м}^3,$$

де $K_{\text{зап}}$ – коефіцієнт заповнення ферментера.

Отже, вибираємо стандартний ферментер об'ємом $V_{\phi} = 10 \text{ м}^3$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зф}} = V_{\text{цк}}/V_{\phi} = 5,7/10 = 0,57$$

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують $V_{\text{кр}} = 5,7 \text{ м}^3$ культуральної рідини.

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом з врахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10%) становитиме:

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}}/(1-E_{\phi}) = 5,7/(1-0,1) = 6,3 \text{ м}^3,$$

де E_{ϕ} – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{\text{роб.1}} = 6,3 \text{ м}^3$.

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,7$ можливий геометричний об'єм ферментера $V_{\phi.1} = 6,3/0,6 = 10,5 \text{ м}^3$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 10 \text{ м}^3$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.1}} = V_{\text{роб.1}}/V_{\text{сф}} = 6,3/10 = 0,63$$

Уточнений коефіцієнт дозволяється для ферментерів без аерації.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10% від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері становитиме:

$$V_{пс1} = V_{роб.1} / (1 + X_{ф}) = 6,3 / (1 + 0,1) \approx 5,73 \text{ м}^3$$

де $X_{ф}$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 6,3 - 5,73 = 0,57 \text{ м}^3$$

Для одержання 0,57 м³ інокуляту в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10%). Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становить:

$$V_{роб.2} = V_{пм1} / (1 - E_{ф}) = 0,57 / (1 - 0,1) = 0,63 \text{ м}^3$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{ін} = 0,63 / 0,6 = 1,05 \text{ м}^3$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний посівний апарат $V_{сін} = 1 \text{ м}^3$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап.2} = V_{роб.2} / V_{сін} = 0,63 / 1 = 0,63$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у дозволених межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{пс2} = V_{роб.2} / (1 + X_{ін}) = 0,63 / (1 + 0,1) \approx 0,573 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{пм2} = V_{роб.2} - V_{пс2} = 0,63 - 0,573 = 57 \text{ л}$$

Для одержання 57 л інокуляту в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10%). Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становить:

$$V_{роб.3} = V_{пм2} / (1 - E_{ф}) = 57 / (1 - 0,1) = 63 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{ін2} = 63 / 0,6 = 105 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний посівний апарат $V_{сін2} = 100 \text{ л}$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап.3} = V_{роб.3} / V_{сін2} = 63 / 100 = 0,63$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у дозволених межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{пс3} = V_{роб.3} / (1 + X_{ин}) = 63 / (1 + 0,1) \approx 57,3 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{пм3} = V_{роб.3} - V_{пс3} = 63 - 57,3 = 5,7 \text{ л}$$

Для одержання 5,7 л інокуляту в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплининосy через колектор відпрацьованого повітря (10%). Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становить:

$$V_{роб.4} = V_{пм3} / (1 - E_{ф}) = 5,7 / (1 - 0,1) = 6,3 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{ин3} = 6,3 / 0,6 \approx 10,5$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний посівний апарат $V_{сін3} = 10$ л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап.4} = V_{роб.4} / V_{сін3} = 6,3 / 10 = 0,63$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у дозволених межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{пс4} = V_{роб.4} / (1 + X_{ин}) = 6,3 / (1 + 0,1) \approx 5,73 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{пм4} = V_{роб.4} - V_{пс4} = 6,3 - 5,73 = 0,57 \text{ л}$$

570 мл посівного матеріалу ми можемо отримати використовуючи колби об'ємом 750 мл та коефіцієнтом заповнення $K_{зк} = 0,2$. Кількість колб становитиме:

$$N_{колб} = V_{пм4} / (V_{колб} \times K_{зап}) = 570 / (750 \times 0,2) = 4 \text{ шт.}$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 4 колб.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого культивування у ферментері об'ємом 10 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у 4 етапи.

РОЗДІЛ 4

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1. Обґрунтування вибору біологічного агента, поживного середовища для його культивування та перевірочний розрахунок складу поживного середовища

Здатність до синтезу каротину виявлена у багатьох мікроорганізмів — представників різних таксономічних і фізіологічних груп (бактерії, дріжджі, гриби, водорості), представники наведені в табл. 4.1 [1].

Таблиця 4.1

Мікроорганізми, що синтезують β-каротин

Група	Представники
Бактерії	<i>Mycobacterium phlei</i> , <i>M. stegmatis</i> , <i>M. lacticolum</i> , <i>M. rubrum</i> , <i>M. brevicali</i> , <i>Mycrococcus glutamicus</i> , <i>M. roseum</i> , <i>Actinomyces aureomonopodiales</i> , <i>A. chrysomallus</i> var. <i>carotinoides</i> , <i>A. subflavus</i> , <i>Streptomyces mediolani</i> , <i>Corynebacterium poinsetiae</i> , <i>Pseudomonas</i>
Дріжджі	<i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>R. rubra</i> , <i>R. flava</i> , <i>Sporobolomyces roseus</i> , <i>Rhodospiridium diobovatum</i>
Гриби	<i>Blakeslea trispora</i> , <i>Choanephora conjuncta</i> , <i>C. cucurbitarum</i> , <i>C. circinans</i> , <i>C. heterospora</i> , <i>Phycomyces blakesleeanus</i>
Водорості	<i>Dunaliella salina</i> , <i>D. bardawil</i> , <i>Cyanophyta</i> , <i>Spirulina</i> , <i>Chlorella</i>

Спочатку використовували штами гриба *B. trispora*: 64 (+) і 490 (-); 8А (+) і 8А (-); К1 (+) і К1 (-); К2 (+) і К2 (-). У промислових умовах штамом К2 синтезував 4-4,5 г β-каротину на 1 кг сухої біомаси. На початку 2000-х років селекціоновано штамом ВСД-1, який, порівняно зі штамом К2, синтезував у 2-2,5 рази більше β-каротину (8-10 г на 1 кг сухої біомаси). Штамом ВСД-1 має родовід від клонів штаму К1 і одержаний двоетапною селекцією: на першому етапі – обробкою

					НУХТ БТЕК 06.01.03 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Ірклієнко Н.П.			РОЗДІЛ 4 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Стабніков В.П.					46	90
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

спорово-міцеліальної суспензії гриба 30 % олійною суспензією кристалічного β-каротину, на другому етапі – одержання резистентних до рифампіцину (500 мкг/мл) (+) та (-) статевих форм [1].

Але, все одно найактивнішим продуцентом β-каротину на сьогодні є гетероталічний муковий гриб *Blakeslea trispora* [1].

Для остаточного рішення щодо біологічного агента порівнюємо різних продуцентів β-каротину з метою вибору найкращого (табл. 2.2):

Таблиця 4.2

Характеристика продуцентів β-каротину

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Вихід β-каротину, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
1	2	4	5	6
<i>Rhodotorula glutinis</i> ВКПМ Y-608	Глюкоза - 40,0 КН ₂ РО ₄ - 1,0 (NH ₄) ₂ SO ₄ - 5,0 MgSO ₄ ×7H ₂ O - 0,5 CaCl ₂ - 0,1 NaCl - 0,1 Дріжджовий екстракт - 0,5	6,5	96 год, 28-30°C, pH 5,5, перемішування 200-220 об./хв	Червякова О.П., Шакир И.В., Панфилов В.И., Кузнецов А.Е., Суясов Н.А. Способ получения биомассы каротин синтезирующих микроорганизмов. Номер патента: RU 2553213 С2 Россия. – 10.06.2015.
<i>Blakeslea trispora</i> K2	Зелена патока - 38 Кукурудзяний екстракт - 21,5 КН ₂ РО ₄ - 0,05 Тіамін - 0,0002	6,3	96 год, 28°C, pH 6,1-6,4, перемішування 20-240 об./хв	Мацелюх Б.П., Куницикова Є.О., Куницикова І.С., Стенько А.С., Горна М.С., Безкоровайна Н.К., Бондар І.В. Штам K2 гриба <i>Blakeslea trispora</i> - продуцент бета-каротину. Україна. – 6.12.1994.
<i>Rhodospiridium diobovatum</i> ІМВ Y-5023	Глюкоза - 40 NH ₄ NO ₃ - 2 FeSO ₄ ×7H ₂ O - 0,1 MgSO ₄ - 0,75 KCl - 0,4 K ₂ HPO ₄ - 0,1 КН ₂ РО ₄ - 1,0	6,9	120 год, 22°C на орбітальній качалці при 150 об./хв	Єльчішева Ю., Голтвянський А. Ріст і вміст каротиноїдів дріжджів <i>Rhodospiridium diobovatum</i> ІМВ Y-5023 на натуральних і синтетичних живильних середовищах Вісник Львівського університету. 2015, №70: С. 221 – 229.

Дані наведені в табл. 4.2 вказують, що *Rhodotorula glutinis* ВКПМ Y-608, *Blakeslea trispora* K2 та *Rhodospiridium diobovatum* ІМВ Y-5023 синтезують

приблизно однакову кількість β-каротину та мають прості умови культивування, що також схожі. Однак різна тривалість культивування та склад поживного середовища. На наступному етапі розрахуємо вартість поживних середовищ для культивування продуцентів (табл. 4.3).

Таблиця 4.3

Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів β-каротину

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента, грн/л серед.	Джерело
1	2	3	4	5	6
<i>Rhodotorula glutinis</i> ВКПМ Y-608	KH ₂ PO ₄	1,0	47	0,047	1
	(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0	8,5	0,0425	2
	MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,5	12,8	0,0064	3
	CaCl ₂	0,1	13	0,0013	4
	NaCl	0,1	2,5	0,00025	5
	Дріжджовий екстракт	0,5	55	0,0275	6
	Глюкоза	40,0	42	0,92	7
Вартість 1 л середовища – 1,04 грн					
<i>Blakeslea trispora</i> K2	Зелена патока	38	5	0,19	8
	Кукурудзяний екстракт	21,5	25	0,5375	9
	KH ₂ PO ₄	0,05	30	0,0015	11
	Тіамін	0,0002	51	0,0000102	10
Вартість 1 л середовища – 0,73 грн					
<i>Rhodospiridium diobovatum</i> IMB Y-5023	NH ₄ NO ₃	2	7,2	0,0144	12
	FeSO ₄ ×7H ₂ O	0,1	8	0,0008	13
	MgSO ₄	0,75	12	0,009	14
	KCl	0,4	14	0,0056	15
	K ₂ HPO ₄	0,1	25	0,0025	16
	KH ₂ PO ₄	1	47	0,047	1
	Глюкоза	40	42	0,84	7
Вартість 1 л середовища – 0,91 грн					

Примітка: 1-<https://prom.ua/ua/Kalij-fosfornokislyj-monokalijfosfat.html>; 2-<https://prom.ua/ua/Amonij-sulfat.html>; 3-<https://prom.ua/ua/Mgso4-7h2o.html>; 4-<https://kiev.flagma.ua/uk/hlorid-kalciyu-so28153696-1.html>; 5-<https://kiev.flagma.ua/uk/hlorid-natriyu-uo319994-1.html>; 6-https://www.alibaba.com/trade/search?fsb=y&IndexArea=product_en&CategoryId=&SearchText=Yeast+extract; 7-

https://prom.ua/ua/search?search_term=%D0%B3%D0%BB%D1%8E%D0%BA%D0%BE%D0%B7%D0%B0
 ; 8-<https://kiev.flagma.ua/uk/zelena-patoka-uo6751821-1.html>;
 9-<https://kiev.flagma.ua/uk/kukurudzyaniy-ekstrakt-so11362683-14163-1.html>;
 10-https://prom.ua/ua/search?search_term=%D1%82%D1%96%D0%B0%D0%BC%D1%96%D0%BD; 11-
https://www.alibaba.com/trade/search?fsb=y&IndexArea=product_en&CatId=&SearchText=Potassium+monophosphate&viewtype=&tab=;
 12-https://prom.ua/ua/search?search_term=%D0%9D%D1%96%D1%82%D1%80%D0%B0%D1%82%20%D0%B0%D0%BC%D0%BE%D0%BD%D1%96%D1%8E; 13-
https://prom.ua/ua/search?search_term=FeSO4*7H2O; 14-<https://kiev.flagma.ua/uk/sulfat-magniyu-so461497-1.html>; 15-<https://kiev.flagma.ua/uk/kaliy-hlor-uo1192031-1.html>; 16-<https://kiev.flagma.ua/uk/gidroortofosfat-kaliyu-uo2805635-1.html>;

Відповідно до інформації, наведеної в табл. 4.3, найдешевше середовище для вирощування *Blakeslea trispora* K2. Поживні середовища для вирощування *Rhodotorula glutinis* ВКПМ Y-608 та *Rhodosporidium diobovatum* ІМВ Y-5023 дорожчі несуттєво – на 0,3 та 0,2 грн відповідно. Для остаточного вибору найефективнішого біологічного агента розрахуємо умовну вартість 1 г цільового продукту (табл. 4.4).

Таблиця 4.4

Узагальнення вибору біологічного агента та поживного середовища для культивування

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Вихід цільового продукту, г/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного продукту за годину, г/год*л
1	2	3	4	5	6
<i>Rhodotorula glutinis</i> ВКПМ Y-608	1,04	6,5	0,16	96	0,067
<i>Blakeslea trispora</i> K2	0,73	6,3	0,11	96	0,076
<i>Rhodosporidium diobovatum</i> ІМВ Y-5023	0,91	6,9	0,13	120	0,057

Дані, наведені у табл. 4.4, засвідчують, що умовна вартість β-каротину, синтезованих штамом *Blakeslea trispora* K2, є найнижчою (0,11 грн/г), а кількість утвореного β-каротину за 1 год (0,076 г/год) найвищою. Відповідно вважаємо

найбільш ефективним використанням *Blakeslea trispora* K2 для одержання β -каротину.

У промислових масштабах важливим показником є концентрація виходу цільового продукту. Поживне середовище необхідно підбирати таким чином, щоб компоненти разом давали змогу підвищити продуктивність. Вміст компонентів поживного середовища має бути достатнім для синтезу певної кількості біомаси та цільового продукту. Вміст джерел вуглецю та азоту зазвичай різний під час отримання посівного матеріалу та під час біосинтезу. Для перевірки відповідності середовища поставленому виходу цільового продукту, проводимо розрахунок джерел вуглецю та азоту, оскільки вони визначають рівень біомаси та концентрацію продукту біосинтезу.

Тривалість культивування 96 год, концентрація біомаси – 18 г/л, концентрація екзогенного β -каротину – 6,3 г/л [2].

Розрахунок вмісту джерела вуглецю:

- Потреби для синтезу β -каротину.

Молекулярна маса β -каротину 537. Вміст вуглецю в β -каротині $40 \cdot 12 = 480$ г. В 6,3 г β -каротину буде міститись 5,63 г вуглецю.

- Потреби для синтезу біомаси.

β -каротин синтезується внутрішньоклітинно, його кількість віднімаємо від біомаси: $18 - 6,3 = 11,7$. У біомасі міститься 50% вуглецю, отже, 5,85 г становить вуглець.

Як джерело вуглецю використовують зелену патоку (38 г/л). У 504 г патоки міститься 216 г вуглецю. У 38 г патоки міститься 16,3 г вуглецю.

Загальна кількість вуглецю для синтезу біомаси та β -каротину – 11,5 г/л. Така кількість вуглецю міститься в $(11,5 \cdot 504) / 216 = 26,8$ г зеленої патоки. Враховуючи 40% витрат на холосте окиснення необхідно внести в середовище $(0,4 \cdot 26,8) + 26,8 = 37,5$ г/л зеленої патоки.

Отже, загальна кількість зеленої патоки, яку необхідно внести в середовище, становить 37,5 г/л. Відповідно в наведеному середовищі є достатня кількість зеленої патоки.

Розрахунок вмісту джерела азоту:

β -каротин не містить азоту, тому його кількість розраховуємо виходячи з потреб біомаси.

- Потреби для синтезу біомаси.

В біомасі знаходиться 10% азоту, тобто це 0,8 г з 8 г біомаси.

Джерелом азоту є кукурудзяний екстракт (21,5 г/л). В 1000 г кукурудзяного екстракту міститься 100 г крохмалю. В 162 г крохмалю міститься 72 г вуглецю. В 21,5 г кукурудзяного екстракту міститься 2,15 г крохмалю, а в них $(2,15 \cdot 72) / 162 = 0,96$ г азоту.

Отже, в наведеному середовищі достатня кількість азоту.

В середовищі присутні також всі мікроелементи, які необхідні клітині в дуже малих кількостях. Джерелами елементів є як органічні, так і неорганічні сполуки.

Результати розрахунків наводжу в таблиці 4.5.

Таблиця 4.5

Перерахована кількість компонентів поживного середовища

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л		
	Сумарний	Початковий	В підживлювальному розчині
Зелена патока	38	38	-
Кукурудзяний екстракт	21,5	21,5	-
KH_2PO_4	0,05	0,05	-
Тіамін	0,0002	0,0002	-

Для виробничого біосинтезу *Blakeslea trispora* K2 з метою одержання бета каротину використовують поживне середовище наступного складу (г/л):

- Зелена патока – 38
- Кукурудзяний екстракт – 21,5
- KH_2PO_4 – 0,05
- Тіамін – 0,0002 [2].

Зазначимо, що на етапах підготовки посівного матеріалу використовується поживне середовище іншого складу (г/л): борошно соєве – 23, борошно кукурудзяне – 47, KH_2PO_4 - 0,5, тіамін – 0,002 [2].

Для стимулювання процесу біосинтезу бета-каротину, через 36 год виробничого біосинтезу вносять 0,1% бета-іонуна та 0,01% антиоксиданта [2].

Оскільки розчин тіаміну міститься в дуже малих кількостях, його закупають стерильним, а потім просто вносять необхідну кількість.

Вирощування інокуляту в колбах на качалках

Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *Blakeslea trispora* K2, умовно ділимо його на композиції залежно від режиму стерилізації.

Композиція А: борошно соєве та кукурудзяне. Компоненти попередньо заварюються, задля уникнення утворення грудочок, а також для переведення у доступну форму речовин для мікроорганізмів. Після чого, компоненти стерилізують. Режим стерилізації: 112°C, 30 хв.

Композиція В: KH_2PO_4 (режим стерилізації: 131°C, 40 хв).

Органічні компоненти (композиція А) є термолабільними і потребують м'якого режиму стерилізації. Сіль композиції В стерилізують при стандартній для солей температурі. Стерилізацію проводять в автоклаві.

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 10 л

Склад поживного середовища такий, що композиції не змінюються.

Композиція А: борошно соєве та кукурудзяне. Попереднє заварювання (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

Композиція В: KH_2PO_4 (режим стерилізації: 131°C, 40 хв).

Стерилізацію проводять в автоклаві.

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 100 л

Склад поживного середовища такий, що композиції не змінюються.

Композиція А: борошно соєве та кукурудзяне. Попереднє заварювання (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

Композиція В: KH_2PO_4 (режим стерилізації: 131°C, 40 хв).

Стерилізація композиції В відбувається в посівному апараті, композиція В готується в окремому збірнику на 80 л і потім переноситься в посівний апарат для стерилізації. Композиція А стерилізується в збірнику на 15 л.

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 1 м³

Склад поживного середовища такий, що композиції не змінюються.

Композиція А: борошно соєве та кукурудзяне. Попереднє заварювання (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

Композиція В: KH_2PO_4 (режим стерилізації: 131°C, 40 хв).

Стерилізація композиції В відбувається в посівному апараті, композиція В готується в окремому збірнику на 800 л і потім переноситься в посівний апарат для стерилізації. Композиція А стерилізується в збірнику на 150 л.

Вирощування культури в ферментері об'ємом 10 м³

Склад композицій та компонентів поживного середовища змінюється.

Композиція А: зелена патока, кукурудзяний екстракт (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

Композиція В: KH_2PO_4 (режим стерилізації: 131°C, 40 хв).

Композиція А готується та стерилізується в збірнику на 1 500 л. Композиція В готується в окремому збірнику на 7 000 л, з якого переноситься в ферментер, де відбувається її стерилізація.

Окрім стадій підготовки поживного середовища, мають бути також додаткові стадії приготування та стерилізації 6% розчинів HCl і NaOH для доведення рН середовища при стерилізації в посівних апаратах об'ємом 10, 100, 1000 л та в ферментері 10 м³.

4.2. Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера

В процесі біосинтезу важливим є правильний вибір умов культивування продуцента – *Blakeslea trispora* K2. Від цього залежить приріст біомаси мікроорганізму, а отже й кількість синтезованого продукту.

Для найбільш ефективного культивування та синтезу цільового продукту є необхідними наступні умови:

- Глибинне культивування – підходить для отримання спорангіїв, які можуть рости як на поверхні, так і в товщі середовища [2].
- Аерація – необхідна для підвищення ефективності культивування за рахунок підвищення *Blakeslea trispora* K2 доступу до кисню [2].
- Температура 28°C – *Blakeslea trispora* K2 представник еукаріотів, тому оптимальною температурою буде 28-30°C [2].
- рН 6,1-6,4 – згідно проведених досліджень такий рН буде оптимальним для досягнення високого рівня синтезу біомаси та продукту біосинтезу, виходячи з властивостей [2].

Вибір ферментеру ґрунтується на умовах, які необхідно забезпечити для найбільшого виходу цільового продукту, це напівбезперервне культивування, можливість аерації, глибинного культивування та регуляція інших умов біосинтезу. Крім того, важливим є вибір типу мішалки, оскільки від цього залежить якість перемішування середовища. В даному випадку (біосинтез інсуліну) найкраще використовувати гвинтову мішалку, тому що в'язкість середовища є малою. Гвинтова мішалка забезпечить інтенсивне перемішування при досить низькій енергоємності [66].

Напівпромислові біореактори групи компаній Sartorius (Німеччина) призначені для інкубації біологічних культур в оптимальних умовах. Для цього в апараті створюють і підтримують необхідний температурний режим, кисневе середовище та тиск. Напівпромислові пристрої використовуються для відпрацювання технологічних процесів культивування, а також для дрібносерійного виробництва на невеликих підприємствах [67].

Напівпромислові біореактори Sartorius конструюють з урахуванням особливостей процесів біосинтезу і складаються з наступних важливих елементів:

- Пристрої теплообміну. Температура підтримується нагрівальними елементами, охолодження відбувається через зміювик, зовнішня тепловіддача забезпечується кожухом.

- Прилади для перемішування. Можуть бути представлені механічними пропелерами з лопатями або системами повітряно-газової циркуляції.
- Пристрої аерації - використовуються для насичення живильного середовища киснем (у деяких типах апаратів).
- Елементи для автоклавування. Стерилізація більшості сучасних ферментерів відбувається автоматично.
- Датчики різних типів для контролю температури, густини розчиненого кисню, кислотності середовища, тиску, рівня піни і ін.
- Мікропроцесор для автоматизації контролю роботи обладнання.
- Додаткові опціональні прилади: «холодний палець» для водяного охолодження, піногасники хімічні і механічні, дозуючі головки, асептичні системи пробозабора і ін.

Асортимент сучасних ферментерів представлений моделями різної модифікації, які вибираються з урахуванням характеру і обсягу завдань. Для культивування клітинних культур підходить ферментер Biostat D-DCU (рис. 4.1) [67].



Рис.4.1. Ферментер Biostat D-DCU

4.3. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту

Сьогодні бета каротин має багато способів застосування. Це сфери сільського господарства (корми, добавки), харчової промисловості (барвник, добавка) та медицини (препарати бета каротину, в тому числі як антиоксидант). Відповідно, склад та ступінь очищення каротиновмісного продукту залежать від призначення.

Зазначимо, що в даному випадку запропоновано використання каротину як харчової добавки для сільськогосподарських тварин [1].

Типові етапи виділення та очищення β -каротину включають екстрагування каротину з біомаси, відділення його від біомаси, очищення, кристалізацію та висушування [1]. Проте для використання в сільському господарстві відділення міцелію не є необхідним, більше того, використовують саме каротиновмісну біомасу. Це зумовлено легкістю та дешевизною одержання, простотою зберігання та підвищеною поживною цінністю продукту. Крім того, зменшуються втрати при виділенні β -каротину.

Отже, етапи отримання продукту складають:

1. Відділення біомаси.
2. Сушіння.

Відомі різні способи **відділення міцелію** *Blakeslea trispora* K2 від культуральної рідини: сепарування, центрифугування, фільтрація.

При використанні сепарування фактично немає втрат біомаси, проте необхідне складне дороговартісне обладнання, а висока температура процесу швидко пришвидшує псування такого обладнання [68].

Фільтрування є доволі простим та продуктивним процесом, проте на виході дає великі втрати біомаси та налипання клітин на фільтрі [69].

Центрифугування має високу продуктивність і швидкість процесу, низькі втрати та регульовані параметри, проте потребує дороговартісного обладнання [70].

При виборі способу відділення біомаси мукорового гриба, необхідно звернути увагу на утворюваний міцелій. Міцелій гриба *Blakeslea trispora* K2 складається з тісно перепланих гіфів різної довжини і товщини, що характеризуються сильною базofilією. Гіфи грибів (рис. 4.2) мають тенденцію до необмеженого росту і в умовах постійного оновлення компонентів середовища і безперервного виведення токсинів здатні рости нескінченно. Поверхня гіфів має численні апекси і плодіві здуття [71].

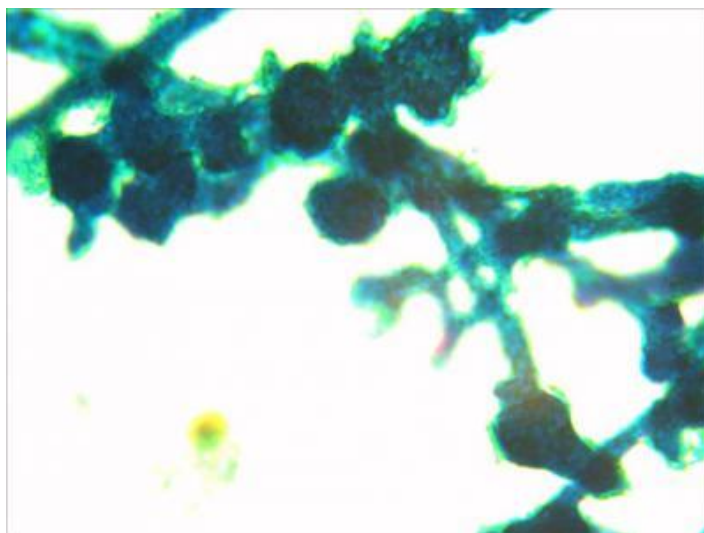


Рис. 4.2. Міцелій гриба *Blakeslea trispora* на стадії глибинного вирощування в інокуляторах

Зважаючи на різні характеристики апаратів, всі три методи концентрування можуть бути використані. Тому для остаточного вибору порівнюємо різні апарати.

Порівнюємо апарати для концентрування, що підходять за параметрами, в табл. 4.1 [72, 73]:

Таблиця 4.1

Порівняння апаратів

Параметр	СЕРА Z 101/Z 101 GP	BRF 120
Тип	Сепаруюча центрифуга	Стрічковий вакуум фільтр
Максимальний проток, л/г	3000	10 000
Максимальна кі-сть, об/хв	14 000	40 500
Максимальне прискорення, g	15 500	-
Максимальний робочий об'єм:	10 л	12 м ²
Потужність, кВт:	2,2	1,1-7,5
Корпус	нержавіюча сталь 1.4401	нержавіюча сталь
Вивантаження біомаси	ручне	автоматичне

Згідно наведених даних, стрічковий фільтр за продуктивністю більше підходить. Крім того немає даних щодо накручування міцелію на центрифугу. Також ручне вивантаження осаду не дуже підходить, оскільки об'єм культуральної рідини, відповідно і біомаси, великий – 6 м³. В той же час у стрічковому фільтрі

осад зрізіється ножом одразу в тару. Тому для відділення міцелію *Blakeslea trispora* K2 від культуральної рідини будемо використовувати промисловий стрічковий вакуум-фільтр BRF 120 (рис. 4.3) [73].



Рис. 4.3. Стрічковий вакуум-фільтр BRF 120

Попередньо культуральну рідину інактивують нагріванням при температурі $(75\pm 5)^\circ\text{C}$ протягом 10 хв [74].

Після фільтрування біомаса направляється на сушіння.

На даний час для сушіння β -каротину використовують вакуумне сушіння та випарювання.

Вакуумне сушіння – сушіння, що відбувається у герметичних камерах за тиску, нижчого від атмосферного. Вакуумну сушарку можна використовувати для сушіння термочутливих гігроскопічних і токсичних матеріалів [75].

Матеріал, що висушується, поміщають у спеціальний автоклав чи герметичну камеру, де створюється розрідження повітря. Оскільки температура кипіння води у вакуумі є нижчою, ніж при атмосферному тиску, то, створюючи вакуум глибиною $0,9 \text{ кг/см}^2$, температуру сушильного агента можна знизити до $40\text{--}45^\circ\text{C}$. У такий спосіб можна вести інтенсивний і, разом з тим, низькотемпературний процес сушіння при повному збереженні природних властивостей деревини [75].

Випарюванням називається процес концентрування рідких розчинів практично нелетких речовин шляхом часткового видалення розчинника під час кипіння рідини. У процесі випарювання розчинник видаляється з усього об'єму

розчину, водночас за температур нижчих за температуру кипіння випаровування рідини відбувається лише з поверхні розчину [75].

При випарюванні відбувається зменшення кількості леткого розчинника й підвищення концентрації нелетких речовин. У більшості випадків цей процес проводять при інтенсивному підведенні тепла, для забезпечення кипіння рідини й утворення парів розчинника. Пара, що утворюється над киплячою рідиною, називається вторинною (вода, етанол і ін.) [75].

Залежно від властивостей рідин, що випарюються (мало концентровані, рухливі або в'язкі, наявність термолабільних біологічно активних речовин та ін.), а також від параметрів гріючої пари, випарювання здійснюють при нормальному тиску або під вакуумом у робочій камері апарата (випарника) [75].

З метою збереження діючих речовин випарювання з кипінням рідини здійснюють в установках, у яких вторинна пара, що утворюється над рідиною, постійно видаляється з робочої частини апарата (випарника), що створює розрідження (вакуум) і знижену температуру кипіння (40-55°C) [76].

Безпосередньо випарювання не забезпечує необхідну експлуатаційну вологість матеріалу і застосовується лише для сушіння пиломатеріалів до транспортної вологості, тобто до $WK = 22\%$ [75].

Проведення процесу випарювання під вакуумом має істотні переваги: знижується температура кипіння розчину, уловлюється цінна вторинна пара, для нагрівання випарного апарата можна використати пару низького тиску. Внаслідок зниження точки кипіння рідини збільшується середня різниця температур між гріючою парою і рідиною, що обігрівається, а це призводить до зменшення необхідних розмірів випарного апарата [76].

Обидва способи є ефективними, проте нам необхідна дуже низька вологість висушеного продукту – 6-7%. Випарювання не може забезпечити такий результат. Його можна досягнути використавши вакуумне сушіння. Інші параметри сушіння: 5-8 годин при температурі 50-60°C [75].

В табл. 4.2 порівнюємо вакуумні сушарки [72, 73]:

Порівняння вакуумних сушарок

Параметр	Вакуумна низькотемпературна барабанна сушарка	Вакуумна сушарка з гребковою мішалкою
Потужність, кВт	14	3
Робочий об'єм, л	300	600
Частота обертів мішалки, об/хв	-	10
Корпус	Нержавіюча сталь AISI 304 і AISI 316	Нержавіюча сталь

Характеристики обох апаратів схожі. Обираємо вакуумну низькотемпературну барабанну сушарку BIORUSGV300 (рис.4.4), оскільки її робочий об'єм ближче до об'єму біомаси після центрифугування, що дозволить сушити біомасу з одного циклу за одну загрузку апарату і робочий об'єм не буде простоюватись. Призначений апарат для сушки у сприятливих температурних режимах термолабільних продуктів тваринного і рослинного походження: біомаси живих культур мікроорганізмів, концентратів білків, рослинних екстрактів і натуральних барвників [72].



Рис.4.4. Вакуумна низькотемпературна барабанна сушарка BIORUSGV300

Процеси роботи даного обладнання максимально наближені до процесів сублімації сушіння, але не вимагають попереднього заморожування і забезпечують безперервний режим подачі сировини і відведення готового продукту. Ми

приймаємо це з теоретичного розрахунку концентрування центрифугуванням до 40% вологості [72].

Після сушіння готовий висушений продукт направляють на фасування та пакування.

4.4. Обґрунтування вибору товарної форми випуску продукту мікробного синтезу (упаковки)

β -каротин частіше за все використовують як провітамін А (харчова добавка), антиоксидант та барвник. Відповідно випуск β -каротину здійснюють в різних формах – порошок, таблетки, капсули та інші товарні форми. Використання всіх цих форм є доцільним з поправкою на ціль випуску продукту [76].

В нашому випадку бета каротин використовують в складі кормів та преміксів для коней. Вважаємо доцільним випуск у вигляді порошку біомаси *Blakeslea trispora* K2, що містить β -каротин (рис.4.5). Готовий продукт являє собою сипучий порошок від жовтогарячо-червоного до червоно-коричневого кольору з специфічним запахом [77, 78].



Рис.4.5. Товарна форма β -каротиновмісної біомаси *Blakeslea trispora*

Зазначимо, що при мікробіологічному синтезі β -каротину не використовують небезпечні речовини (як при хімічному синтезі), тому для наведених цілей немає необхідності в багатоступеневій ретельній очистці продукту.

Для надання продукту товарної форми, необхідно провести подрібнення, оскільки після сушіння каротиновмісна біомаса являє собою дрібнопластинкову масу або сипучий порошок [79].

Для подрібнення будемо використовувати дробарку. Дробарки бувають роторні, молоткові, валкові та декові. Загалом всі вони мають схожі принципи дії та підходять для наших цілей. Тому обираємо згідно продуктивності.

Обираємо валкову дробарку ДВГ 200Х125 (рис. 4.6). Базові характеристики дробарки наведені в табл. 4.3 [80]:

Таблиця 4.3

Характеристики валкової дробарки ДВГ 200Х125

Параметр	Значення
Середній розмір частинок продукту дроблення, мм	0,3
Продуктивність, кг / год	25 - 300
Потужність електродвигунів, кВт	2x1,1
Частоти обертання валів, об / хв.	650 і 670



Рис.4.6. Валкова дробарка

4.4. Обґрунтування вибору товарної форми випуску β -каротину (упаковки)

Можливими упаковками є паперові, поліетиленові пакети, скляні та металеві банки. Упаковка, в якій зберігаються зоотовари, повинна відповідати таким вимогам:

- міцність;

- щільність;
- вологостійкість;
- повітронепроникність;
- аромастійкість;
- стійкість до механічних пошкоджень [81].

Суттєвим недоліком скляних банок є можливість биття, велика вага та порівняно висока ціна. Паперові пакети можуть пропускати вологу, тобто не забезпечують довготривалого зберігання. Металеві банки підходять за всіма критеріями, проте ціна такого пакування, в тому числі апарату для запайки банок, буде значно вища за пакування в поліетиленові пакети [81].

Очевидно, що найкращим чином всім цим вимогам відповідають різні вироби з пластику. Продукт упаковують в щільні мішки з внутрішнім фольгованим шаром для захисту від сирості та сторонніх запахів. Отже, в даному випадку найкращим варіантом буде пакування в поліетиленові пакети (*рис. 4.7*) [81].



Рис.4.7. Поліетиленовий пакет для пакування з фольгованим шаром

Фасування порошків можливе напівавтоматично за допомогою шнекових і вакуумних дозаторів, або ж автоматично за допомогою пакувальних апаратів.

Зазвичай пакувальні апарати налаштовані на пакування в якийсь певний вид пакування, тоді як в напівавтоматичному способі упаковка може бути будь-якою. В автоматичних апаратах (лініях) забезпечується зберігання чистоти продукції, що є сумнівним при використанні дозаторів.

Порівняння різних апаратів наведено в табл. 4.4 [82, 83]:

Порівняння фасувально-пакувального обладнання

Параметр	Автомат фасувально-пакувальний NP-SH1000 (зі шнековим дозатором)	Дозатор ваговий FOYER FZ-2000 вібротковий прямої дії
Матеріал корпусу	нержавіюча сталь	нержавіюча сталь
Діапазон зважування, г	100-1000	10-2000
Продуктивність, упаковок/хв	20-30	3-10
Потужність, кВт	1,8	0,2
Напруга живлення, В/Гц	220/50	220/50
Габаритні розміри, мм	790 x 600 x 1980	680 x 400 x 1300
Вага машини, кг	380	32
Ціна, грн	225 150	21 000

З даних, наведених в *табл. 4.4*, бачимо, що фасувально-пакувальний апарат є набагато дорожчим, важчим та більш обмежений в діапазоні зважування. Оскільки чистота не є пріоритетним критерієм з огляду на сферу застосування β -каротину, обираємо для використання Дозатор ваговий FOYER FZ-2000 вібротковий прямої дії (рис.4.8). Фасують в поліетиленові пакети з фольгованим шаром по 2 кг продукту [84].



Рис.4.8. Дозатор ваговий FOYER FZ-2000

РОЗДІЛ 5 СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, зазначеного в апаратурній схемі, наведена в табл. 5.1.

Таблиця 5.1

Позиція	Найменування	Кі-сть	Технічна характеристика
ПЗ – 1	Повітрязабірник	1	Обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень
Ф- 2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр грубої очистки повітря EU3 (G3) ФВП-2. Утримує до 90% контрольного забруднювача, який у зваженому стані подається до магістралу. Габарити (ш×в×г, мм): 592×592×96. Виробник: «Електромент» (Росія) ¹
К- 3	Компресор	1	Компресор повітряний Hessler TH-8 GERMANY. Потужність двигуна: 2400 Вт. Продуктивність: 290 л/хв. Продуктивність на виході: 170 л/хв. Максимальний тиск: 8 бар. Об'єм ресивера: 50 л. Виробник: «Hessler» (Германія) ²
Т-4 Т-6	Теплообмінник-охолоджувач Теплообмінник-нагрівач	2	Мідноалюмінієвий теплообмінник в трьохрядному виконанні, з крапле-влівлювачем і піддоном з патрубками для відводу конденсату, теплоносій-пара або вода. Матеріал ламелей – алюміній. Товщина ламелей 0,2 мм, крок 2,5 мм. Виробник: ООО «ОЛЛТАН плюс» (Україна) ³
Р-5	Ресивер	1	Ресивер для стисненого повітря на 900 л. Матеріал – сталь 09Г2С. Температура стін від -65 до +180°С. Габарити ресивера: (в×д, мм): 1885×812. Укомплектований манометром, кранами, запобіжним та зворотним клапанами. Виробник: «Центррезервуарсервис» (Україна) ⁴
Ф-7	Головний фільтр очистки повітря	1	Фільтр тонкого очищення стисненого повітря ОМІ HF 0010 1/2". Продуктивність: 1170 л/хв. Діаметр підкл., дюйм: ½. Продуктивність: 70 м ³ /год. Макс. тиск: 16 бар. Розміри (мм): 220х90. Макс. температура повітря на вході: 100°С. Е = 95 %. Виробник: «ОМІ» (Італія) ⁵
Ф-8 Ф-11 Ф-14 Ф-19	Фільтр індивідуальної очистки	4	НЕРА фільтр. Площа фільтрації 14,5 м ² . Габарити (в×ш×д, мм): 610×610×150. Номінальна пропускна здатність: 1450 м ² . Виробник: «Технофільтр» (Україна) ⁶

НУХТ БТЕК 06.01.03 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Ірклієнко Н.П.		
Перевір.		Стабніков В.П.		
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.		Стабніков В.П.		
РОЗДІЛ 5 СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ			Літ.	Арк.
				65
			Кафедра БТМ	
			Аркушів	90

I-9	Інокулятор на 10 л	1	Ферментер BioFlo® 320 об'ємом 10 л. Матеріал – борсилікатне скло, нержавіюча сталь 316 L. Оснащений сорочкою, та датчиками рН, температури та рівня газу. Габарити ферментера: (в×d, мм): 729×323. Виробник: «Eppendorf» (Германія) ⁷
H-10	Насос перистальтичний	1	Перистальтичний насос AquaViva CI/PH 7 л/год (КТНХ) з авто-дозацією, регулюванням швидкості. Дозування: 1.5 л/год. Тиск: 3 бар. Потужність: 20 Вт. Виробник: «AquaViva» (Італія) ⁸
I-12	Інокулятор на 100 л	1	Ферментер на 100 л. Матеріал: сталь марки 316L, 304L. Оснащений сорочкою, портами для датчиків рН, DO, піни, рівнемірів, порти для посіву. Швидкість обертання: 50~800 об./хв. Виробник: «BIORUS» (Росія) ⁹
H-13	Насос перистальтичний	1	Перистальтичний шланговий насос ВНЗ-V. Продуктивність: 100 л/год. Тиск: 1,5 бар. Електроприводом насоса являється редукторний двигун 90-260 В, потужністю 20 Вт, швидкість обертання валу до 150 об/хв. Виробник: «ETATRON D.S.» (Італія) ¹⁰
I-15	Інокулятор на 1 м ³	1	Ферментер на 1000 л. Матеріал: сталь марки 304L. Оснащений сорочкою, портами для датчиків рН, DO, піни, рівнемірів, порти для посіву. Швидкість обертання: 50-300 об./хв. Виробник: «BIORUS» (Росія) ¹¹
H-16	Насос перистальтичний	1	Насос перистальтичний MP-1136-22. Продуктивність - 630 л/год. Напір - до 8 бар. Двигун - 0,55 кВт. Виробник: «DEBEM» (Італія) ¹²
P-17	Реактор-змішувач на 15 л	1	Реактор PC-15. Матеріал: сталь марки 316L. Оснащений сорочкою, може підключатись до СІР мийки. Виробник: ООО «КАБЕЛЬФАРМТЕХНИКА» (Україна) ¹³
H-18	Насос перистальтичний	1	Насос перистальтичний AQUAVIVA AMM200 SLAVE. Продуктивність до 14 л/год. Допустимий тиск у системі трубопроводу: від 1 до 10 бар. Виробник: «AquaViva» (Італія) ¹⁴
Ф-20	Ферментер на 10 м ³	1	Ферментер на 10000 л. Матеріал: сталь марки 316L. Швидкість обертання: 50-300 об./хв. Оснащений сорочкою, та датчиками рН, температури та рівня газу. Виробник: ООО «ДИАРТЕК» (Росія) ¹⁵
H-21	Насос відцентровий	1	Відцентровий насос Delta CPM 158. Продуктивність: 6 м ³ . Потужність: 750 Вт. Ведучий вал - нержавіюча сталь. Виробник: «Delta» (Китай) ¹⁶
З-22	Збірник для зберігання культуральної рідини	1	Збірник об'ємом 8000 л, матеріал - нержавіюча кислотостійка сталь AISI 316L, потужність мотора 1,5 кВт, оснащений сорочкою. Виробник: «Стройторгсервіс» (Україна) ¹⁷

Н-23 Н-25	Шестерний гідравлічний насос	2	Шестерний гідравлічний насос, продуктивність 81 л/хв, тиск 210/3046 ф./кв.д., температура роботи 40-60°C, швидкість обертання 300-3000 об/хв. Виробник: Hirosan (Туреччина) ¹⁸
Ф-24	Стрічковий вакуум фільтр	1	Стрічковий вакуум фільтр BRF 120, матеріал нержавіюча сталь, продуктивність 10 м ³ /год, максимальна площа фільтрації 12 м ² , потужність 1,1-7,5 кВт. Виробник: «КемИНС» (Росія) ¹⁹
ВС-26	Вакуумна сушарка	1	Вакуумна низькотемпературна барабанна сушарка BIORUSGV300 Робочий об'єм 300 л, матеріал корпусу нержавіюча сталь AISI 304 і AISI 316, робочий тиск 3 бар, робоча температура 35+°C, потужність 14 кВт. Виробник: «Біорус» (Росія) ²⁰
ВД-27	Дозатор ваговий	1	Дозатор ваговий FOYER FZ-2000 вібротолковий прямої дії. Матеріал корпусу нержавіюча сталь, діапазон зважування 10-2000 г, продуктивність 3-10 уп/хв, точність зважування ±2 г, робочий діапазон температур 10-40°C, потужність 0,2 кВт, напруга живлення 220/50 В/Гц, габаритні розміри 680 x 400 x 1300 мм, вага 32 кг. Виробник: «Козак» (Україна) ²¹

Примітка: 1 - <https://electrovent.ru/ventilyaciya/filtry-dlya-ventilyacii/filtry-gruboj-ochistki/filtr-vozdushnyj-panelnyj-fvp-2/>, 2 - https://efco.ua/ru/kompresor-povitryaniy-hesler-th-8-germany-50l-garantiya-64-misyatsya/478/?gclid=CjwKCAiAo4OQBhBBEiwA5KWu_9aUpRA0bCkiLVVEPIfAWNorClv7XRR2H55oAIAHkeI0avwmM02bcRoCtI0QAvD_BwE, 3 - <https://alltan.com.ua/p2090292-teploobmennik-vodyanoj.html>, 4 - <https://rezervuary.com/p1250235107-vozduhosbornik-resiver-vozdushnyj.html>, 5 - <https://sm-tools.com.ua/p108763-filtr-tonkoy-ochistki-szhatogo-vozduha-omi-hf-0010-1-2-04a-0060-hg00-h-0000>, 6 - <https://tehnofilter.ub.ua/ru/goods/view/6364274/all/filtr-tonkoy-ochistki-vozduha-ftov-hepa-hepa/>, 7 - http://www.alsi.ua/index.php?page=menu_new_brunswick&id=626, 8 - <https://rozetka.com.ua/278883158/p278883158/>, 9 - <https://bio-rus.ru/primeryi-specifikaciz/pilotnyj-fermenter-100-litrov-dlya-glubinnogo-kultivirovaniya.html>, 10 - https://www.etatron.com.ua/pumps/peristaltic_pumps/bh3-v/, 11 - <https://bio-rus.ru/primeryi-specifikaciz/promyishlennyj-fermenter-biorus-1000-l-dlya-veterinarii.html>, 12 - https://www.debem.com.ua/ukr/nasos/peristalticheskie_nasosy/mp-11/, 13 - <http://www.kft2.com.ua/reaktor15.html>, 14 - <https://xn--80aaf5ahx2a.com.ua/p663061030-membrannyj-doiziruyuschij-nasos.html>, 15 - <http://diartech.ru/product/plant-bioreactor-1-35tonn/>, 16 - <https://bigl.ua/ua/p1156172441-tsentrobeznyj-nasos-750>, 17 - <https://stprom.com.ua/>, 18 - <https://hydromarket.com.ua/p458550155-shesterenchatyj-shesternyj-gidravlicheskiy.html>, 19 - https://www.cesolutions.ru/production/obezvozhivanie_i_filtratsiya/lentochnye_vakuumnye_filtry/, 20 - <https://bio-rus.ru/oborudovanie/sushilka-barabannaya/>, 21 - <https://kozakplus.ua/products/granule-packaging-machines/fz-2000>

РОЗДІЛ 6

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема біосинтезу бета каротину *Blakeslea trispora* K2 включає допоміжні роботи – санітарну підготовку виробництва, підготовку аераційного повітря, підготовку і стерилізацію розчинів титрувальних агентів, поживних середовищ для культивування в колбах на качалці, посівних апаратах та ферментері, та саме технологічний процес - підготовку посівного матеріалу і біосинтез бета каротину.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка миючих та дезінфікуючих засобів

ДР 1.2. Підготовка виробничих приміщень

ДР 1.2.1. Щоденне прибирання

Використовуючи 0,2% розчину хлорантоїну прибирають підлогу, зовнішні поверхні обладнання, комунікацій і трубопроводів, змочують килимки при вході в усі приміщення. Контролюють якість прибирання роблячи змиви, КУО < 800/см².

ДР 1.2.2. Генеральне прибирання

Використовуючи 0,2% розчину хлорантоїну прибирають підлогу, стіни, вікна, двері, зовнішні поверхні обладнання, комунікацій і трубопроводів, змочують килимки при вході у всі приміщення. Після прибирання вмикають ультрафіолетову лампу, коли в приміщенні нікого немає. Контролюють якість прибирання роблячи змиви, КУО < 300/см².

ДР 1.3. Підготовка обладнання та комунікацій

ДР 1.3.1. Миття

Миття обладнання та комунікацій відбувається автоматично за допомогою мийної системи СП.

					НУХТ БТЕК 06.01.03 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>	<i>Ірклієнко Н.П.</i>				РОЗДІЛ 6 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>						68	91
<i>Реценз.</i>						Кафедра БТМ		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>							

ДР 1.3.2. Технічний огляд

Технічний огляд здійснюють візуально. У разі знаходження видимих неущільнень в комунікаціях та запірній арматурі проводять підтягування різьбових з'єднань.

ДР 1.3.3. Перевірка на герметичність

На апараті закривають усю запірну арматуру і подають аераційне повітря до набору надлишкового тиску $P = 0,1-0,2$ МПа. Перекривають вентиль подачі повітря і фіксують покази манометра на кришці апарату та час витримки (30–60 хв) в операційному журналі. Якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа, вважають, що апарат герметичний. В іншому випадку здійснюють пошук неущільнень на апараті та у місцях з'єднання запірної арматури з комунікаціями з використанням галогенових течієпошукачів. Перед набором тиску в апарат вносять чотирихлорний карбон, закривають усю запірну арматуру, апарат нагрівають до температури 80°C і збільшують тиск в апараті до 0,2 МПа. Пари чотирихлорного карбону проникають через неущільнення і виявляються у разі наближення щупа течієпошукача до них. Тривалість перевірки одного апарату становить 60 хв. У разі виявлення неущільнень здійснюють операції з їх ліквідації як описано вище.

ДР 1.3.4. Стерилізація

В сорочку апарата подають насичену пару і прогрівають апарат до температури 80–90°C. Відкривають усю запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях та підведених до апарата комунікаціях і подають гостру пару безпосередньо в апарат через барботер або нижній спуск, попередньо відкривши вентиль виходу відпрацьованого повітря для видалення повітря з апарату. При досягненні в апараті температури стерилізації ($t = 130-135^\circ\text{C}$) закривають усю запірну арматуру на апараті, крім парової, і витримують заданий час стерилізації (60 хв). При стерилізації апарата паралельно стерилізують індивідуальні фільтри стерильного та відпрацьованого повітря. Закривають усю запірну арматуру та арматуру подачі пари в апарат. У сорочку подають холодну воду. Для компенсації падіння тиску (утворення вакууму при конденсації пари в апараті) в апарат подають

стерильне повітря. Процес охолодження здійснюють до досягнення температури до 30–40°C і надлишкового тиску $P = 0,003\text{--}0,005$ МПа.

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря здійснюють за допомогою вертикальної труби з повітрязабірником, який знаходиться на 3 м вище від рівня даху будівлі, де розміщене обладнання для стиснення та очищення повітря.

ДР 2.2. Очищення повітря від пилу і механічних часток

Першочергово повітря очищають від пилу ($\delta > 50$ мкм) на тканинних фільтрах грубого очищення. Ступінь очищення становить 80%.

ДР 2.3. Стиснення повітря

Проводять стиснення повітря в компресорі до тиску $P=0,35$ МПа, при чому повітря нагрівається до температури 120-250°C.

ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Охолодження стисненого повітря до температури "точки роси" (25-30°C), за якої волога повітря конденсується, відбувається у водяному теплообміннику. Зайву вологу видаляють у краплевловлювачі ресивера, де зменшують пульсації руху повітря, що можуть негативно впливати на роботу подальших фільтрів очищення повітря. Вологість повітря має становити 60-70%.

ДР 2.5. Нагрівання повітря

Повітря нагрівають до температури 45-50°C парою теплообміннику для стабілізації показників тиску та температури. Вологість повітря має становити 50%.

ДР 2.6. Очищення повітря на головному фільтрі

Очищають повітря у головних ємнісних набивних фільтрах, які встановлюють поблизу ферментаційних відділень, до ступеня очищення $E=95\%$.

ДР 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Повітря від головних фільтрів через трубопроводи подають до індивідуальних фільтрів, встановлених безпосередньо перед кожним ферментером. При цьому повітря очищають до ступеня очищення $E 99,99\%$.

ДР 3. Приготування та стерилізація титрувальних розчинів

ДР 3.1. Приготування 6% розчину хлоридної кислоти

ДР 3.1.1. Приготування 6% розчину хлоридної кислоти для посівного апарату об'ємом 10 л.

Під витяжною шафою в колбу об'ємом 50 мл вносять 6,8 мл води дистильованої, тільки після чого піпеткою при постійному перемішуванні додають 5,2 мл 37% розчину хлоридної кислоти. Для уникнення сильної екзотермічної реакції рідини обов'язково змішують в такому порядку, а не навпаки. Колбу закривають скляною пробкою.

ДР 3.1.2. Приготування 6% розчину хлоридної кислоти для посівного апарату об'ємом 100 л.

Під витяжною шафою в колбу об'ємом 250 мл вносять 68 мл води дистильованої, після чого за допомогою циліндра при постійному перемішуванні додають 52 мл 37% розчину хлоридної кислоти. Колбу закривають скляною пробкою.

ДР 3.1.3. Приготування 6% розчину хлоридної кислоти для посівного апарату об'ємом 1 м³.

Під витяжною шафою в колбу об'ємом 2 л вносять 680 мл води дистильованої, після чого за допомогою циліндра при постійному перемішуванні додають 520 мл 37% розчину хлоридної кислоти. Колбу закривають скляною пробкою.

ДР 3.1.4. Приготування 6% розчину хлоридної кислоти для ферментера об'ємом 10 м³.

Під витяжною шафою в колбу об'ємом 20 л вносять 6,8 л води дистильованої, після чого за допомогою циліндра при постійному перемішуванні додають 5,2 л 37% розчину хлоридної кислоти. Колбу закривають скляною пробкою.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація 6% розчину натрію гідроксиду

ДР 3.2.1. Приготування та стерилізація 6% розчину натрію гідроксиду для посівного апарату об'ємом 10 л.

На технічних вагах зважують 0,72 г амонію гідроксиду, вносять у колбу об'ємом 50 мл. Доливають 11,28 мл води дистильованої. Стерилізують фільтрацією

з використанням гладкого фільтрувального паперу. Колбу закривають скляною пробкою.

ДР 3.2.2. Приготування та стерилізація 6% розчину натрію гідроксиду для посівного апарату об'ємом 100 л.

На технічних вагах зважують 7,2 г амонію гідроксиду, вносять у колбу об'ємом 250 мл. Доливають 112,8 мл води дистильованої. Стерилізують фільтрацією з використанням гладкого фільтрувального паперу. Колбу закривають скляною пробкою.

ДР 3.2.3. Приготування та стерилізація 6% розчину натрію гідроксиду для посівного апарату об'ємом 1 м³.

На технічних вагах зважують 72 г амонію гідроксиду, вносять у колбу об'ємом 2 л. Доливають 1128 мл води дистильованої. Стерилізують фільтрацією з використанням гладкого фільтрувального паперу. Колбу закривають скляною пробкою.

ДР 3.2.4. Приготування та стерилізація 6% розчину натрію гідроксиду для ферментера об'ємом 10 м³.

На технічних вагах зважують 720 г амонію гідроксиду, вносять у колбу об'ємом 20 л. Доливають 11,28 л води дистильованої. Стерилізують фільтрацією з використанням гладкого фільтрувального паперу. Колбу закривають скляною пробкою.

ДР 4. Підготовка заварювальних компонентів

Попередньо потрібно заварити соєвий та кукурудзяне борошно. Необхідна кількість борошна, яке необхідно заварити та простерилізувати зазначено в табл. 6.1.

Таблиця 6.1.

Необхідна кількість борошна на стадіях вирощування інокуляту

<i>Стадія</i>	Об'єм композиції, л	Кількість соєвого борошна, г	Кількість кукурудзяного борошна, г
Колби	0,5	13,8	28,2
Інокулятор на 10 л	3	138	282

Інокулятор на 100 л	51	1380	2820
Інокулятор на 1000 л	537	13800	28200
Ферментер	5390	138000	282000

ДР 4.1. Заварювання та стерилізація борошна для стадій вирощування інокуляту в колбах

На технічних вагах зважується 13,8 г соєвого та 28,2 г кукурудзяного борошна. Наважка переноситься у конічну колбу об'ємом 1 л. За допомогою мірного циліндру на 500 мл доливають 458 мл дистильованої води (60 °С). Колбу закривають ватно-марлевою кришкою. Субстанцію ретельно перемішують 1 годину, підтримуючи сталу температуру. Після заварювання, композиція стерилізується при 112 °С, 0,05 МПа протягом 30 хв.

ДР 4.2. Заварювання та стерилізація борошна для стадій вирощування інокуляту в інокуляторі на 10 л

На технічних вагах зважується 138 г соєвого та 282 г кукурудзяного борошна. Наважка переноситься у конічну колбу об'ємом 5 л. За допомогою мірного циліндру на 5 л доливають 2580 мл дистильованої води (60 °С). Колбу закривають ватно-марлевою кришкою. Субстанцію ретельно перемішують 1 годину, підтримуючи сталу температуру. Після заварювання, композиція стерилізується при 112 °С, 0,05 МПа протягом 30 хв.

ДР 4.3. Заварювання та стерилізація борошна для стадій вирощування інокуляту в інокуляторі на 100 л

На технічних вагах зважується 1380 г соєвого та 2820 г кукурудзяного борошна. Наважка передається до інокулятора на 100 л. Доливають 41,7 л питної води (60 °С). Реактор закривають кришкою та ретельно перемішують субстанцію 1 годину, підтримуючи сталу температуру. Після заварювання, до реактора подається насичена пара. Композиція стерилізується при 112 °С, 0,05 МПа протягом 30 хв.

ДР 4.4. Заварювання та стерилізація борошна для стадій вирощування інокуляту в інокуляторі на 1 м³

На ваговому дозаторі зважується 13,8 кг соєвого та 28,2 кг кукурудзяного борошна. Наважка передається до інокулятора на 1000 л. Доливають 441,3 л питної води (60 °С). Реактор закривають кришкою та ретельно перемішують субстанцію 1 годину, підтримуючи сталу температуру. Після заварювання, до реактора подається насичена пара. Композиція стерилізується при 112 °С, 0,05 МПа протягом 30 хв.

ДР 4.5. Заварювання та стерилізація борошна для стадії виробничого біосинтезу

На ваговому дозаторі зважується 138 кг соєвого та 282 кг кукурудзяного борошна. Наважка передається до ферментеру. Доливають 4431 л питної води (60 °С). Реактор закривають кришкою та ретельно перемішують субстанцію 1 годину, підтримуючи сталу температуру. Після заварювання, до реактора подається насичена пара. Композиція стерилізується при 112 °С, 0,05 МПа протягом 30 хв.

ДР 5. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 5.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці

На першій стадії необхідно приготувати 600 мл поживного середовища. Вміст тіаміну дуже малий, тому при розрахунку об'ємів композицій він не враховується. Вміст компонентів для цієї стадії наведено в табл. 6.2.

Таблиця 6.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 600 мл середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 600 мл середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Соєве борошно	23	13,8	А*	500
Кукурудзяне борошно	47	28,2		
КН ₂ РО ₄	0,5	0,3	В	100
Всього 600 мл				

Примітка: *-композиція попередньо заварюється та стерилізується (див. ДР 4.1)

ДР 5.1.1. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 0,3 г KH_2PO_4 . Наважку переносять в колбу на 0,5 л, додають 95 мл води дистильованої, перемішують, колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві 40 хв при 131°C.

ДР 5.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті на 10 л

Вирощування інокуляту в посівному апараті на 10 л потребує 6 л поживного середовища. Вміст тіаміну дуже малий, тому при розрахунку об'ємів композицій він не враховується. Крім того, 10% (0,6 л) припадає на посівний матеріал, що також враховується при складанні композицій. Вміст компонентів для цієї стадії наведено в табл. 6.3.

Таблиця 6.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 6 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 6 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Соєве борошно	23	138	А*	3
Кукурудзяне борошно	47	282		
KH_2PO_4	0,5	3	В	2,4
				Всього 5,4 л

Примітка: *-композиція попередньо заварюється та стерилізується (див. ДР 4.2)

ДР 5.2.1. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 3 г KH_2PO_4 . Наважку переносять в колбу на 5 л, додають 5 л води дистильованої, перемішують, колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві 40 хв при 131°C.

ДР 5.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті на 100 л

Вирощування інокуляту в посівному апараті на 100 л потребує 60 л поживного середовища. Вміст тіаміну дуже малий, тому при розрахунку об'ємів композицій він не враховується. Крім того, 10% (6 л) припадає на посівний матеріал та 10% (6 л) - на конденсат, який утворюється під час стерилізації гострою парою, що також враховується при складанні композицій. Вміст компонентів для цієї стадії наведено в *табл. 6.4*.

Таблиця 6.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 60 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 60 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Соєве борошно	23	1 380	А	51
Кукурудзяне борошно	47	2 820		
КН ₂ РО ₄	0,5	30	В	3
				Всього 54 л

Примітка: *-композиція попередньо заварюється та стерилізується (див. ДР 4.3)

ДР 5.3.1. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 30 г КН₂РО₄. Наважку переносять в колбу на 5 л, додають 4,97 л води дистильованої, перемішують, колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві 40 хв при 131°C.

ДР 5.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті на 1 м³

Вирощування інокуляту в посівному апараті на 1 м³ потребує 600 л поживного середовища. Вміст тіаміну дуже малий, тому при розрахунку об'ємів композицій він не враховується. Крім того, 10% (60 л) припадає на посівний матеріал та 10% (60 л) - на конденсат, який утворюється під час стерилізації

гострою парою, що також враховується при складанні композицій. Вміст компонентів для цієї стадії наведено в *табл. 6.5*.

Таблиця 6.5

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 600 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 600 л середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
Соєве борошно	23	13,8	А*	537
Кукурудзяне борошно	47	28,2		
КН ₂ РО ₄	0,5	0,3	В	3
Всього 540 л				

Примітка: *-композиція попередньо заварюється та стерилізується (див. ДР 4.4)

ДР 5.4.1. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 300 г КН₂РО₄. Наважку переносять в колбу на 5 л, додають 4,7 л води дистильованої, перемішують, колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві 40 хв при 131°C.

ДР 5.5. Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері на 10 м³

Для процесу біосинтезу необхідно 6 000 л поживного середовища, Кз = 0,6. Вміст композицій при процесі біосинтезу дещо змінюється. Вміст тіаміну дуже малий, тому при розрахунку об'ємів композицій він не враховується. Крім того, 10% (600 л) припадає на посівний матеріал та 10% (600 л) - на конденсат, який утворюється під час стерилізації гострою парою, що також враховується при складанні композицій. Вміст компонентів для цієї стадії наведено в *табл. 6.6*.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 6 000 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 6 000 л середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
Соєве борошно	23	138	А*	5390
Кукурудзяне борошно	47	282		
КН ₂ РО ₄	0,5	3	В	10
Всього 5 400 л				

Примітка: *-композиція попередньо заварюється та стерилізується (див. ДР 4.5)

ДР 5.5.1. Приготування і стерилізація композиції В

Через об'ємно-ваговий дозатор в збірник об'ємом 15 л вносять 3 кг КН₂РО₄. При постійному перемішуванні 50-100 об/хв через об'ємно-ваговий дозатор подають 6 л води питної. Після розчинення солі композицію подають в посівний апарат об'ємом 10 м³ насосом. Стерилізують композицію подачею гострої пари 40 хв при температурі 131°C.

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу**ТП 6.1. Підтримання колекційної культури**

Колекційну культуру *Blakeslea trispora* K2 зберігають в ампулах з гліцерином при температурі -80°C. У роботі з колекційною культурою дотримуються асептичних умов.

ТП 6.2. Одержання культури в рідкому середовищі

Для активації колекційної культури, що зберігають в ампулах з гліцерином, необхідно додати в ампулу стерильне рідке картопляне декстрозне середовище в кількості 1 мл. Суспензію з середовищем перемішують в ампулі, переносять в пробірку з 5 мл рідкого стерильного картопляного декстрозного середовища. Вміст

пробірки ретельно перемішують. Відбирають пробу 0,1 мл на встановлення мікробіологічної чистоти.

ТП 6.3. Одержання робочої культури

Вміст пробірки (від ТП 5.2) кількістю 0,2 мл піпеткою переносять в пробірки з напіврідким картопляним декстрозним середовищем. Вирощують 5 днів при рН 7,0 та $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Після цього відбирають проби по 0,1 мл на встановлення мікробіологічної чистоти.

ТП 6.4. Вирощування культури в колбах на качалці

В колбу з композицією А (від ДР 4.1) в асептичних умовах вносять композицію В (від ДР 5.1.1) та 4 мл розчину тіаміну. Середовище розливають по 150 мл в 4 колби ємністю 750 мл для вирощування на качалці.

З пробірок із робочою культурою *Blakeslea trisora* K2 відбирають піпетками бактеріальну суспензію та вносять в колби з поживним середовищем, при чому одна пробірка використовується для засіву однієї колби. Культивування проводять 48 год [2] за температури 28°C при перемішуванні 220 об/хв. Після цього відбирають проби по 0,1 мл з колби на встановлення мікробіологічної чистоти, а також проби для визначення рівня біомаси (має бути 0,5-1,0 г/л).

Після проведення мікробіологічного контролю посівний матеріал з колб вносять в стерильну засівну колбу об'ємом 1 л.

ТП 6.5. Вирощування культури в посівному апараті 10 л

В стерильну засівну колбу на 10 л в асептичних умовах вносять композицію А (від ДР 4.2), композицією В (від ДР 5.2.1) та 40 мл розчину тіаміну.

В посівний апарат в асептичних умовах вносять вміст засівної колби. З засівної колби вносять посівний матеріал (від ТП 6.4). При необхідності вносять титрувальні розчини (від ДР 3.1.1, ДР 3.2.1) до встановлення рН на рівні 6,1-6,4.

Культивування проводять 48 год [2] за температури 28°C при перемішуванні 220 об/хв. Кожні 8 год відбирають проби по 0,1 мл на встановлення мікробіологічної чистоти, а також проби для визначення рівня біомаси (на кінець культивування має бути 0,5-1,0 г/л).

ТП 6.6. Вирощування культури в посівному апараті 100 л

В посівний апарат зі стерильною композицією А (від ДР 4.3) в асептичних умовах вносять композицію В (від ДР 5.3.1) та 400 мл розчину тіаміну. Далі через трубу перетиснення подають посівний матеріал (від ТП 6.5). При необхідності вносять титрувальні розчини (від ДР 3.1.2, ДР 3.2.2) до встановлення рН на рівні 6,1-6,4.

Культивування проводять 48 год [2] за температури 28°C при перемішуванні 220 об/хв. Кожні 8 год відбирають проби по 0,1 мл на встановлення мікробіологічної чистоти, а також проби для визначення рівня біомаси (на кінець культивування має бути 0,5-1,0 г/л).

ТП 6.7. Вирощування культури в посівному апараті 1 м³

В посівний апарат зі стерильною композицією А (від ДР 4.4) в асептичних умовах вносять композицію В (від ДР 4.4.1) та 4 л розчину тіаміну. Далі через трубу перетиснення подають посівний матеріал (від ТП 6.6). При необхідності вносять титрувальні розчини (від ДР 3.1.3, ДР 3.2.3) до встановлення рН на рівні 6,1-6,4.

Культивування проводять 48 год [2] за температури 28°C при перемішуванні 220 об/хв. Кожні 8 год відбирають проби по 0,1 мл на встановлення мікробіологічної чистоти, а також проби для визначення рівня біомаси (на кінець культивування має бути 0,5-1,0 г/л).

ТП 7. Біосинтез

Виробниче культивування здійснюють в ферментері з робочим об'ємом 6000 л. В ферментер, зі стерильною композицією В (від ДР 5.5.1) в асептичних умовах подають композицію А (від ДР 4.5) та 40 л розчину тіаміну. При необхідності вносять титрувальні розчини (від ДР 3.1.4, ДР 3.2.4) до встановлення рН на рівні 6,1-6,4. Через трубу перетиснення з посівного апарату в ферментер подають посівний матеріал (від ТП 6.7).

Культивування триває 96 год при температурі 28°C з постійною аерацією, перемішуванням 220 об/хв. Через 36 год культивування вносять 0,1% бета-іона та 0,01% антиоксиданта.

Кожні 6 годин з ферментера відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси. Показники умов

культивування регулюються за допомогою автоматичних датчиків температури, тиску, рН протягом всього процесу виробничого культивування. Виробничий біосинтез завершують при досягненні концентрації бета каротину – 6,3 г/л.

ТП 8. Концентрування.

Після виробничого біосинтезу з ферментера насосом перекачують культуральну рідину у кількості 6000 л в збірник [З-22]. Звідти культуральну рідину подають на стрічковий вакуум фільтр [Ф-24] насосом [Н-23] зі швидкістю 6000 л/год до повного спустошення збірника.

ТП 9. Вакуумне висушування

Вологу біомасу подають в вакуумну сушарку [ВС-26] насосом [Н-25]. Вмикають сушарку. Висушування проходить за температури 50°C. Після завершення висушування (через 5-8 год) сушарку вимикають, висушений продукт вручну розвантажують із сушарки.

ПМВ 10. Пакування, маркування, відвантаження.

ПМВ 10.1. Фасування готового продукту в поліетиленові пакети

Сухий порошок каротиновмісної біомаси *Blakeslea trispora* K2 в кількості 108 кг після дробарки вручну засипають у ваговий дозатор [ВД-28]. Ставлять дозування 2000 г. Вниз апарата підставляють поліетиленовий пакет, вмикають апарат, він дозує, засипає порошок в пакет і запаює його. Повторюють фасування до повної розфасовки продукту.

ПМВ 10.2. Маркування

Запакований продукт маркують. В маркуванні вказують назву товару, фірмове найменування виробника та місце його знаходження, склад та основні властивості товару, спосіб застосування та умови зберігання, вагу, дату та місце виробництва, пакування, правила та умови безпечного використання, термін придатності, наносять ідентифікаційний штрих-код.

ПМВ 10.3. Пакування в картонні коробки

Промарковані пакети вручну складають у картонні коробки, заклеюють коробки клейкою стрічкою та відвантажують.

РОЗДІЛ 7

КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

7.1. Мікробіологічний контроль

7.1.1. Мікроскопіювання нативних препаратів

Для мікроскопування використовують препарати «роздавлена крапля». Препарат «роздавлена крапля» готують на знежиреному предметному склі, на яке наносять маленьку краплю культуральної рідини чи стерильного поживного середовища, накривають накривним скельцем і розглядають зі збільшенням $\times 400$ та $\times 900$ (з імерсійною олією).

В препаратах з культуральної рідини мають бути наявні ниткоподібні, потужні гіфи, часто з перетяжками, можливе утворення клубків. Субстратний міцелій від сірувато-помаранчевого до жовто-помаранчевого забарвленням субстрату. Відзначається інтенсивне спороутворення, представлене стілоспорангіями та спорангіями. Стілоспорангії 50×100 мкм, спорангії кулясті, $12 \times 16 - 10 \times 14$ мкм [2]. В препаратах зі стерильного поживного середовища не має бути мікроорганізмів.

7.1.2. Висів на поживні середовища

З метою перевірки або підтвердження наявності сторонньої мікробіоти, пробу з культуральної рідини чи стерильного поживного середовища мікробіологічною петлею висівають методом виснажуючого штриха для отримання ізольованих колоній на МПА для виявлення бактерій та на сусло-агар для виявлення грибів. Інкубацію проводять 24 год при температурах $30-35^{\circ}\text{C}$ та $20-25^{\circ}\text{C}$ відповідно.

При висівах культуральної рідини на МПА росту не повинно бути, на сусло-агарі має бути субстратний міцелій (+) світло-оранжевого або жовтого кольору, та (-) форма яскраво-оранжевого до червоного кольору. На місці стику спільного зростання обох статевих форм утворюється зона яскраво-оранжевого

					<i>НУХТ БТЕК 06.01.03 КР ПЗ</i>					
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>						
<i>Розроб.</i>		<i>Ірклієнко Н.П.</i>			РОЗДІЛ 7 КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА					
<i>Перевір.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Реценз.</i>									83	90
<i>Н. Контр.</i>								<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>								

або яскраво-оранжево-червоного кольору шириною 15-25 мм. При висівах зі стерильного поживного середовища не має бути колоній на жодному з середовищ. При висівах проб після прибирання загальна кількість КУО має бути не більше 800/см² після щоденного прибирання та не більше 300/см² після генерального прибирання.

7.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

Пробопідготовка: Біомасу збирають центрифугуванням (12 000 об/хв), зібрані вологі клітини ретельно промивають три рази дистильованою водою для видалення залишкових солей. Одну порцію вологої біомаси використовують для вилучення та аналізу, іншу – для визначення біомаси. Супернатант після центрифугування використовують для визначення джерел вуглецю та азоту.

7.2.1. Концентрація біомаси

Контроль концентрації біомаси *Blakeslea trispora* K2 здійснюють ваговим методом. Порцію біомаси висушують у вакуумі при температурі 45°C та 0,08 МПа протягом 48 год. Висушені клітини зважують для визначення сухої біомаси [85].

7.2.2. Концентрація цільового продукту

Концентрацію β-каротину визначають з використанням високоефективної рідинної хроматографії [5].

Відділення та розчинення тілець включення: порцію вологої біомаси 20 мг змішують з 1 мл етилацетату та пропускають через гранулятор протягом 6 хв. β-каротин екстрагують етилацетатом при кімнатній температурі поки органічний екстракт не стане прозорим [86].

Методика: Визначення проводять з використанням колонки УМС30 RP-30 (4,6 мм × 250 мм × 5 мм). Аналіз проводять при 25°C при швидкості потоку 1 мл/хв і спектрофотометричному детектуванні при 450 нм. Обсяг уприскування розчину становить 2 мкл. Використовують градієнт двох буферів А (0,05 М амонію ацетат) і В (100% ТВМЕ). Обидва розчинники містять 0,1% (мас./Об.) бутильованого гідрокситолуолу та 0,05% (об./Об.) триетиламіну. Елюювання проводять за такою програмою: ізократично при 3% В протягом 2 хв з подальшим лінійним градієнтом від 2% до 38% В за 1 хв, ізократично при 15% протягом 12 хв, лінійне збільшення

до 68% В в 1 хв, ізократично при 68% протягом 6 хв з подальшим лінійним зменшенням до 3% В за 4 хв [5].

7.2.3. Концентрація джерела вуглецю та азоту

Джерелом вуглецю в середовищі є зелена патока, а **джерелом азоту** – кукурудзяний екстракт.

Аналіз супернатанту проводять методом іонообмінної хроматографії на колонці Hupercarb (100 × 4 мм), що дозволяє виявити вуглеводи різного походження.

Аналіз проводять при 70°C при швидкості потоку 1 мл/хв і детектуванні розсіювання світла. Обсяг уприскування розчину становить 20 мкл. Використовують градієнт буферу ацетонітрилу [87].

7.3. Контроль готового продукту

7.3.1. Технологічний контроль

Ефективне проведення біотехнологічних процесів тісно пов'язане з вдосконаленням методів контролю і управління. В загальному підхід до контролю процесу біосинтезу є системним для точного та ефективного культивування. Сучасні процеси потребують реєстрації та аналізу безлічі швидкоплинних факторів (концентрації субстрату, біомаси та продукту в культурі, рН, температури, парціального тиску кисню та ін.). Це викликає необхідність використання техніки, що дозволяє проводити легке керування процесом культивування. Принципи їх дії базуються на зчитуванні показань з датчиків та перетворення цієї інформації в легкодоступній формі. Розроблено методи автоматичного контролю окремих параметрів процесу [88].

Технологічний контроль готового продукту має на увазі опис, контроль маркування та пакування і транспортування [89].

Контроль маркування проводиться згідно загально прийнятих вимог до всіх порошків. Має бути вказано назву товару, фірмове найменування виробника та місце його знаходження, склад та основні властивості товару, спосіб застосування та умови зберігання, вага, дата та місце виробництва, пакування, правила та умови

безпечного використання, термін придатності, наносять ідентифікаційний штрих-код.

Контроль пакування проводиться візуально. Пакети мають бути цілі, без зламів, тріщин, вигинів, мають бути закритими щільно. Картонні коробки мають бути цілі, без зламів, подряпин [89].

Контроль транспортування проводиться перед відгрузкою продукту. Транспортування має проводитись в умовах низьких температур, нормальної вологості [89].

Опис – контроль зовнішнього виду продукту. Має бути сипучий порошок від жовтогарячо-червоного до червоно-коричневого кольору з специфічним запахом [89].

7.3.2. Фізико-хімічний контроль

Фізико-хімічні властивості включають в себе втрату в масі при висушуванні, кількісне визначення, розмір часток [89].

Фізико-хімічні властивості перевіряють перед пакуванням та в готовій запакованій продукції.

Кількісне визначення проводять методом ВЕРХ, що є сучасним точним методом. Інші фізико-хімічні властивості перевіряють стандартними методами. Втрату в масі при висушуванні визначають висушуванням в бюксах. Розмір часток контролюють ситовим методом [89, 90].

Втрата в масі при висушуванні:

Для проведення аналізу використовують бюкси діаметром 25 мм і висотою 35 мм. Точну наважку 0,15-0,20 г випробуваного зразка поміщають в бюкс і висушують (з відкритою кришкою), при температурі $60 \pm 1^\circ\text{C}$ та залишковому тиску не більше 0,667 кПа, протягом 3 годин. Відкритий бюкс разом з кришкою поміщають в ексікатор для охолодження на 40 хв, після чого закривають кришкою

$$X = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100\% ,$$

і зважують. Втрату в масі при висушуванні (X) у відсотках обчислюють за формулою:

де: m_1 - маса бюкса, доведеного до постійної маси, г; m_2 - маса бюкса з випробуваним зразком до висушування, г; m_3 - маса бюкса з випробуваним зразком після висушування, г [89].

Нормальною вважається втрата в масі до 5%.

Кількісне визначення:

Відділення та розчинення тілець включення: порцію біомаси 20 мг змішують з 1 мл етилацетату та пропускають через гранулятор протягом 6 хв. β -каротин екстрагують етилацетатом при кімнатній температурі поки органічний екстракт не стане прозорим [91].

Методика: Визначення проводять з використанням колонки YMC30 RP-30 (4,6 мм \times 250 мм \times 5 мм). Аналіз проводять при 25°C при швидкості потоку 1 мл/хв і спектрофотометричному детектуванні при 450 нм. Обсяг уприскування розчину становить 2 мкл. Використовують градієнт двох буферів А (0,05 М амонію ацетат) і В (100% ТВМЕ). Обидва розчинники містять 0,1% (мас./Об.) бутильованого гідрокситолуолу та 0,05% (об./Об.) триетиламіну. Елюювання проводять за такою програмою: ізократично при 3% В протягом 2 хв з подальшим лінійним градієнтом від 2% до 38% В за 1 хв, ізократично при 15% протягом 12 хв, лінійне збільшення до 68% В в 1 хв, ізократично при 68% протягом 6 хв з подальшим лінійним зменшенням до 3% В за 4 хв [90].

Вміст бета каротину в готовому продукті має бути 30-35%.

Фракційний склад:

Визначають масу кожного сита з точністю до 0,1 г. Точну наважку випробуваної речовини поміщають на верхнє сито і закривають кришкою. Проводять просіювання протягом встановленого часу, потім обережно (без втрат речовини) знову зважують кожне сито і визначають масу речовини на кожному з сит. Таким же способом визначають масу речовини на піддоні.

Фракційний склад порошоків і гранул і розподіл часток за розмірами висловлюють у вигляді масової частки порошку, просіяного через сита, у відсотках. При цьому слід вказати масу випробуваного зразка, час просіювання, метод випробування. При необхідності додатково вказують умови проведення

випробування (вологість, температура, використання антистатиків, обладнання та ін.).

Середній розмір часток порошку має бути 0,3 мм.

7.3.3. Біологічний контроль

Біологічний контроль не проводять, оскільки біомаса інактивована, мікробіологічний контроль не є необхідним. Біологічний контроль бета каротину не перевіряють, так як використовують продукт для сільського господарства як добавку.

7.4. Карта постадійного контролю

Карта постадійного контролю представлена в таблиці 7.1

Таблиця 7.1

Карта постадійного контролю

<i>Номер контрольної точки та назва стадії</i>	<i>Об'єкт контролю та показник, що визначається</i>	<i>Засоби та методи контролю</i>	<i>Періодичність перевірки та відбору проб</i>	<i>Нормативні значення показника</i>
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
ДР 1.2. Підготовка виробничих приміщень Км 1.2.1	Вміст мікроорганізмів в у повітрі	Роблять змиви	Кожну операцію	КУО < 800/см ² КУО < 300/см ²
ДР 1.3. Підготовка обладнання та комунікацій Кт 1.3.1; Кт 1.3.2; Км 1.3.4	Миття	Візуально	Кожну операцію	t = 60 °C, 20 хв
	Геометричність	Падіння тиску не перевищує 0,01 МПа		P = 0,2 МПа, 60 хв
	Температура стерилізації	Регулятор температур		t = 130-135 °C
	Тривалість стерилізації	Годинник		60 хв
ДР 2. Підготовка аераційного повітря Кт 2.1 Кт 2.2 Кт 2.3 Кт 2.3 Кт 2.4 Кт 2.5 Кт 2.6	Очищення	Тканинні фільтри	Постійно протягом процесу	E = 80%
	Тиск	Манометр		P=0,35 МПа
	Вологість	Психрометр		w = 60-70%
	Температура	Термометр		t = 50 °C

ДР 3. Приготування та стерилізація титрувальних розчинів Кт 3.1.1 - Кт 3.1.4 Кт Км 3.2.1 – Кт Км 3.2.4	Дозування компонентів	Дозуючий пристрій, ваговий метод	Кожну операцію	відсутність мікробіоти
ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ	Дозування компонентів	Дозуючий пристрій, ваговий метод	Кожну операцію	Згідно з технологією
	Мікробіологічна чистота	Висів		відсутність мікробіоти
	Параметри стерилізації	Автоклав, гострою парою		t = 112 °C, 30 хв, t = 131 °C, 40 хв,
ТП 5 Підготовка посівного матеріалу Кт 5.1 Кт Км 5.2 – Кт Км 5.4; Кт Кх Км 5.5 Кт Кх Км 5.6	Температура	Термометр	Постійно протягом процесу	t = 28 °C
	Тривалість культивування	Годинник		48 год, 220 об/хв, рН 6,1-6,4,
	Мікробіологічна чистота	Відбір проби в колби 0,1 мл	Кожну операцію	відсутність сторонньої мікробіоти, морфологічна однорідність
ТП 6 Біосинтез Кт Кх Км	Температура	Термометр	Постійно протягом процесу	t = 28 °C
	Тривалість культивування	Годинник		96 год, 220 об/хв,
	Мікробіологічна чистота	Відбір проби	Кожну операцію	рН = 6,2; відсутність сторонньої мікробіоти, мікробіологічна однорідність, концентрація біомаси, цільового продукту
ТП 7 Кт Концентрування	Культуральна рідина Швидкість подачі культуральної рідини, вологовміст	Спідометр технічний, вологомір	Швидкість подачі визначається безперервно, вологовміст визначається на виході з апарату	w = 6000 л/год, Cc = 35-40%

Закінчення табл. 7.1

ТП 8 Кт Вакуумне висушування	Волога біомаса Температура, час, вологоміст	Термометр технічний, годинник, вологомір	Температура та час визначаються безперервно, вологоміст через 5 год і потім кожна годину	$t = 50^{\circ}\text{C}$, $\tau = 5-8$ год, $C_c = 93-95\%$
ТП 9 Кт Подрібнення	Висушена біомаса Швидкість подрібнення, середній розмір часток, частота обертання валу	Спідометр технічний, тахометр технічний, розмір часток ситовим методом	Швидкість подрібнення і частота обертання валу визначаються безперервно, розмір часток визначається після подрібнення	$w = 100$ кг/год, $w = 650$ і 670 об/хв, сер. розмір часток $0,3$ мм
ПМВ 10.1 Кт Фасування готового продукту в поліетиленові пакети	Порошок продукту Маса порошку в одному пакеті	Дозатор фасувального апарату	Під час зважування порошку	$m = 2000$ г
ПМВ 10.2 Кт Маркування	Висушена біомаса в поліетиленових пакетах Правильність маркування	Правильність маркування згідно вимог до маркування	Після нанесення маркування	Правильність маркування
ПМВ 10.3 Кт Пакування в картонні коробки	Промарковани й продукт в поліетиленових пакетах Кількість упаковок у коборці	Підрахунок	Підрахунок під час пакування	Кількість упаковок у коборці

ВИСНОВКИ

1. Бета-каротин має значну роль в забезпеченні багатьох фізіологічних функцій організму. На відміну від вітаміну А, надлишки в організмі його провітамінів не викликають виникнення токсичного ефекту.

2. Застосування бета каротину має широке розповсюдження. Гаразі його використовують в олійно-жировій, кондитерській, м'ясомолочній, продуктоконсервній, фармацевтичній, нутрицевтичній, косметичній та в галузі тваринництва.

3. Синтез бета каротину можливий хімічним та біотехнологічним способом. Хімічний синтез каротину складний та дорогавартісний, тому використовують біотехнологічне одержання за допомогою мікроорганізмів. Комерційний β -каротин в основному виробляють з використанням каротиногенних мікроорганізмів, таких як *B. trispora*, *R. glutinis*, *Sphingomonas* sp. та *P. blakesleanus*.

4. За техніко-економічним обґрунтуванням визначено сегмент забезпечення бета каротином, а саме конярство. Пропонується забезпечувати 30% від загальної кількості. Потреба у попереднику вітаміну А становить 2 452,8 кг.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Буценко Л.М., Пенчук Ю.М., Пирог Т.П. Технології мікробного синтезу лікарських засобів: Навч. посіб. – К.: НУХТ, 2010. – 323 с.
2. Мацелюх Б.П., Кунщикова Є.О., Кунщикова І.С., Стенько А.С., Горна М.С., Безкоровайна Н.К., Бондар І.В. Штам К2 гриба *Blakeslea trispora* - продуцент бета-каротину. Україна. – 6.12.1994.
3. Бета-каротин, или провитамин витамина А. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.fondation-louisbonduelle.org/ru/nutrient/%D0%B1%D0%B5%D1%82%D0%B0-%D0%BA%D0%B0%D1%80%D0%BE%D1%82%D0%B8%D0%BD/>
4. Сааков В.С. Альтернативные пути биосинтеза каротиноидов у *Procaryota* и *Eucaryota*. Докл. АН России. – 2003. – Т.392. – № 6. – С. 825—831.
5. Jing K., He S., Chen T., Lu Y., Ng I.-S. Enhancing beta-carotene biosynthesis and gene transcriptional regulation in *Blakeslea trispora* with sodium acetate. *Biochemical Engineering Journal*. 2016, 114: 10–17. doi: 10.1016/j.bej.2016.06.015.
6. Артюхова С.И., Бондарева Г.И. Биотехнология новых форм каротиноидных препаратов на основе микробного синтеза. *Россия молодая: передовые технологии – в промышленность!* 2013, 3: 4-6.
7. Соколова Е.Н., Лакоза О.С., Борщева Ю.А. Сравнительная характеристика штаммов каротиноидных дрожжей - продуцентов белка и β-каротина для создания биотехнологии кормопродуктов. ВНИИПБТ – филиал ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», г. Москва, Россия ст. 214-216
8. Салєба Л.В., Сарібекова Д.Г., Куник О.М., Сарібеков Г.С., Микитенко К.Є. дослідження процесу екстрагування каротиноїдів. *ВІСНИК ХНТУ*. 2016, 2(57): 178-182
9. Червякова О. П., Шакир И. В., Панфилов В. И., Кузнецов А. Е., Суясов Н. А. Способ получения биомассы каротинсинтезирующих микроорганизмов. Дата начала отсчета срока действия патента: 30.05.2012

10. Luis Carlos Mata-Gómez, Julio César Montañez, Alejandro Méndez-Zavala and Cristóbal Noé. Aguilar Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial Cell Factories*. 2014: 1-11
11. Robert J. Greenstein, Liya Su, Sheldon T. Brown. Vitamins A & D Inhibit the Growth of Mycobacteria. In *Radiometric Culture* January 3. 2012
12. Кошиль А.В., Варанкіна О.О. Удосконалення біотехнології каротиноїдів шляхом підвищення продуктивності їх синтезу 2019. – С. 51.
13. Чернов, И.Ю. Дрожжи в природе / И.Ю. Чернов. — Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2013. — 336 с
14. Naghavi, F.S. Effect of temperature, pH and salinity on carotenoid production in *Rhodotorula mucilaginosa* / F.S. Naghavi, P. Hanachi, A. Saboora. — *Research in biotechnology*. — 2014. — №5(4) — P. 1–4.
15. Культивирование дрожжей *Phaffia rhodozyma* при постоянном и периодическом освещении / З.В. Захаров [и др.] // Известия МГТУ «МАМИ». — 2012. — Т. 4, №2(14) — С. 86–89.
16. Кирица, Е. Влияние растительных экстрактов на процесс биосинтеза каротиноидов дрожжами / Е. Кирица. — Вестник АПК Верхневолжья. — 2017. — №3(39) — С. 54–58.
17. The influence of operating conditions on the growth of the yeast *Rhodotorula rubra* ICCF 209 and on torularhodin formation / A. Mihalcea [et al.] // *Rev. Chim. (Bucharest)*. — 2011. — №6 — P. 659–665.
18. Hien, Ly T.M. Effects of nutritional and environmental conditions on carotenoid biosynthesis by *Rhodotorula* sp. / Ly T.M. Hien, Dong T.A. Dao. — *Journal of science Ho Chi Minh city open university*. — 2018. — №8(2) — P. 18–23.
19. Зубарева И. М., Митина Н. Б., Бабич Я. В. Изучение ионов как стимуляторов развития *Blakeslea trispora* ISSN 0321-4095. Вопросы химии и химической технологии. 2012. №3 с. 47-49

20. Шапкина І.Є., Варанкіна О.О., Огурцов О.М. Оптимізація біотехнології отримання каротиноїдів issn 2222-2944. *Інформаційні технології: наука, техніка, технологія, освіта, здоров'я*. 2018. Ч. II с 327
21. Антипов А.С., Низов В.А. Способ получения 2-метил-1,4-нафтохинона (менадиона) с низким содержанием хрома// Сб. докладов Международной научно-практической конференции и школы молодых ученых. 18-19 октября 2018 г., 2018. – С. 62-63.
22. Патент № 2681847 Россия. Способ получения витаминов серии К3/ Антипов А.С., Низов В.А., Гвоздев А.В., Ветлугина А.Ю.// Федеральный институт промышленной собственности.- 2019.
23. Thomas D. C. Tarento, Dale D. McClure, Andrea M. Talbot, Hubert L. Regtop, John R. Biffin, Peter Valtchev. A potential biotechnological process for the sustainable production of vitamin K₁ Pages 1-19 | Received 23 Jan 2018, Accepted 28 Apr 2018, Published online: 24 May 2018
24. Berenjian A, Mahanama R, Kavanagh J, Dehghani F. Vitamin K series: current status and future prospects. *Crit Rev Biotechnol*. 2015;35(2):199–208.
25. Lujing Ren, Cheng Peng, Xuechao Hu, Yiwen Han, HeHuang Microbial production of vitamin K₂: current status and future prospects Available online 17 October 2019.
26. Tien J-H, Pang C-Y, Hsu N-H, inventors; Sunny Pharmatec Inc., assignee. Method of making vitamin K₁. United States patent application publication US2017/0260117 A1. 2017 Sep 14.
27. D. V. Eremin and L. A. Petrov. Preparation of Vitamin K₃ by Oxidation of the Methylanthalene Fraction// *Russian Journal of Applied Chemistry*. – 2011. – 84, 6. – 988- 922.
28. Simona M. Coman Prof., Vasile I. Parvulescu Prof., Stefan Wuttke Dr., Erhard Kemnitz Prof Synthesis of Vitamin K₁ and K₁-Chromanol by Friedel–Crafts Alkylation in Heterogeneous Catalysis 11 January 2010
29. Н.В. Коротченкова, А.А.Иозеп. Химическая технология витаминов. – Санкт-Петербург.: Проспект Науки, 2012. – 224 с.

30. Антипов А.С. Способ получения витаминов серии КЗ / Антипов А.С., Низов В.А., Гвоздев А.В., Ветлугина А.Ю.// Патент РФ № 2681847.Россия Федеральный институт промышленной собственности. - 2017.

31. Л. Л. Гогина, Е. Г. Жижина. Синтез витамина КЗ в растворах мо–v–p-гетерополикислот по реакции диенового синтеза, кинетика и катализ, 2020, том 61, № 2, с. 254–261

32. Хаустова Е.А., Фаткуллина А.Р., Дорохина О.А. Получение витаминов биотехнологическими методами Научно-издательский центр "Мир науки", 2018, с. 159-161

33. Н. Е. Луговська, Г. Г. Луговська, І. Г. Черниш, С. П. Юрасова, В. М. Данилова. Історія створення і вивчення препаратів вітаміну D в лабораторії медичної біохімії Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України за період 1990–2015 рр.

34. Chang-Kyung Kang, Keiichi Yamada, Yoshinosuke Usuki, Akira Ogita, Ken-ichi Fujita and Toshio Tanaka Visualization analysis of the vacuole-targeting fungicidal activity of amphotericin B against the parent strain and an ergosterol-less mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* (2013), 159, 939–947

35. Joshua Wollam and Adam Antebi Sterol Regulation of Metabolism, Homeostasis, and Development. *The Annual Review of Biochemistry* is online at biochem.annualreviews.org. First published online as a Review in Advance on April 12, 2011 885-905

36. Кулебекова А.Д., Мурашева А.С. Использование микроорганизмов в современном получении витаминов группы D. Бюллетень северного государственного медицинского университета. Выпуск XXXXIII № 2 2019 с. 128-129

37. *Lewellin DJ, Lang IA, et al.* Vitamin D and risk of cognitive decline in elderly persons. *Arch. Intern. Med.* 2010; 170 (13): 1135–1141.

38. Разумкова Г. М., Степанова Л. К., Гайдарова Т. В. Использование биотехнологии при производстве жирорастворимых витаминов (D, A, E, K, F) с. 152-157, 2015

39. Кулебекова А. Д. Использование микроорганизмов в современном получении витаминов группы D/A. Д. Кулебекова, А. С. Мурашева ; науч. рук. Р. Г. Коптяева // Бюллетень Северного государственного медицинского университета, 2019, N № 2.-С.128-129.
40. L. Rodrigues The Multifunctional Fungal Ergosterol Marcio The multifunctional fungal ergosterol. *mBio* 9:e01755- 18 18 September 2018
41. Somanon Bhattacharya, Brooke D. Esquivel, a Theodore C. Whitea Overexpression or Deletion of Ergosterol Biosynthesis Genes Alters Doubling Time, Response to Stress Agents, and Drug Susceptibility in *Saccharomyces cerevisiae* 24 July 2018
42. Robert J. Greenstein, Liya Su , Sheldon T. Brown Vitamins A & D Inhibit the Growth of Mycobacteria in Radiometric Culture January 3, 2012
43. Виноградова Р. П., Данилова В. М., Комісарє С. В. Лауреати премії НАН України імені Олександра Володимировича Палладіна за 2013 рік
44. Женатов, Ж.Б. Разработка биотехнологически активных препаратов на основе высокопродуктивных штаммов дрожжей / Ж.Б.Женатов, С.И.Артюхова// Материалы IV международной молодежной научной конференции «Научный потенциал XXI века». Т. 1. – Ставрополь: СевКавГТУ, 2012. – С.301-305.
45. Гудвиллович И. Н. Продукционные характеристики микроводорослей *Dunaliella salina* Теод. и *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross. при интенсивном культивировании: автореф. дис. ... канд. биол. наук / И. Н. Гудвиллович. – Севастополь, 2011. – 25 с.
46. Biotechnological production of carotenoids by yeast: an overview / L.C. Mata-Gomez [et al.] // Microbial cell factories. — 2014. — P. 1–11.
47. *Rhodotorula glutinis* — potential source of lipids, carotenoids, and enzyjmes for use in industries / A.M. Kot [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2016. — Vol. 100 — P. 6103–6117.
48. Optimization of carotenoids production by yeast strains of *Rhodotorula* using salted cheese whey / H.M. Kanzy [et al.] // International journal of current microbiology and applied sciences. — 2015. — Vol. 4, №1 — P. 456–469.

49. Ефименко, Д.Ю. Направленный синтез каротиноидов у дрожжей *Rhodospiridium diobovatum* / Д.Ю. Ефименко. — Студенческая наука XXI века. — 2013. — С. 1–3.
50. Cardoso, L.A. de C. Microbial production of carotenoids — A review / L.A. de C. Cardoso, K.Y.F. Kanno, S.G. Karp. — African journal of biotechnology. — 2017. — Vol. 16(4) — P. 139–146.
51. Ульяновский Н.В., Косяков Д.С., Боголицын К.Г. и др. Разработка экспрессных методов аналитической экстракции каротиноидов из растительного сырья // *Химия растительного сырья*. — 2012. — № 4. — С. 147—152.
52. Chanchay N. Optimal conditions for carotenoid production and antioxidation characteristics by *Rhodotorula rubra* / N. Chanchay, S. Sirisansanuyarul, C. Chaiyasut, N. Poosaran // *World academy of science, engineering and technology*. — 2012. Vol. 68. — P. 8 – 29.
53. Heba M. Kanzy, N.F. Nasr , Hoida A.M. El-Shazly and Olfat S. Barakat Optimization of Carotenoids production by yeast strains of *Rhodotorula* using salted cheese whey/ *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* ISSN: 2319-7706 Volume 4 Number 1 (2015) pp. 456-469
54. Банницына Т. Е., Канарский А.В., Щербаков А.В., Чеботарь В.К., Кипрушкина Е.И. Журнал «Вестник МАХ» № 1, 2016. Статья «Дрожжи в современной биотехнологии».
55. Сімонова М. Каротиноїди: будова, властивості та біологічна дія // *Біологічні Студії*. 2010. Т. 4, №2. С. 159–170.
56. Божко Н. В., Тищенко В. І. Застосування бета-каротину як натурального барвника в ковбасних продуктах. *Праці Таврійського державного агротехнологічного університету. Технічні науки*. 2015, 15(1): 226-233.
57. Кудинова С. П., Белая А. Биологические функции бета-каротина. *Вестник ИМСИТ*. 2014, (1-2): 46-49.
58. Городилова Л. И., Крысенко Ю. Г., Трошин Е. И. Эффективность использования бета-каротина в рационах супоросных свиноматок. *Ученые записки*

Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2015, (223): 52-54.

59. Шмулова Н. В., Козина Е. А. Улучшение качества спермопродукции племенных быков. *Вестник Красноярского государственного аграрного университета.* 2020, (8 (161)): 108-114.

60. Пензева М. Н., Стаценко А. А. Р. М. Эффективность применения новых кормовых добавок в животноводстве. Материалы онлайн-конференции, посвященной Дню российской науки (РФ, г. Белгород, 4 февраля 2015 г.). 21-25 с.

61. Гостев В., Клинский Ю., Чомаев А. Бета-каротин и воспроизводительная функция коров. *Животноводство России.* 2013, (3): 39-40.

62. Гончаренко А. В., Закалюжний, В. М. Стан конярства в Україні. *Проблеми відтворення та охорони біорізноманіття України.* 2016: 8-9.

63. Ліскович В. А. Сучасний стан галузі конярства в Україні та тенденції його розвитку. 2015: 41-42.

64. Шкурупій К. Є., Чижанська Н. В. Використання антиоксидантів в годівлі коней. *Актуальні питання технології продукції тваринництва.* 2019, 1: 100-105.

65. Нормы по витаминам для сельскохозяйственных животных. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://soft-agro.com/kormoproizvodstvo/normy-po-vitaminam-dlya-selskoxozyajstvennyx-zhivotnyx-2010-god.html>

66. Процеси і апарати біотехнологічних виробництв: Метод. рекомендації до вивчення дисципліни, виконання курсових і контрольних робіт для студ. напряму 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навч. / Уклад.: Зав'ялов В.Л., Зоткіна Л.В., Немирович П.М., Бодров В.С., Запорожець Ю.В., Попова Н.В., Мисюра Т.Г. – К.: НУХТ, 2012. – 98 с.

67. BIOSTAT® D-DCU. // Профлаб. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://xn--80ac2aleg3a.xn--p1ai/catalog/fermentery-bioreaktory-polupromyshlennye/biostat-d-dcu/>

68. Пат. 2152929 RU, МКІ С07С403/24. Спосіб очищення технічного β-каротину / Белова В.М.; Озорова Т.І.; Біловодський В.П.; Анакін С.Н.; Серпуховитин І.П.; Гвоздьов Г.Б.; Давидович Д.В.; Кірсанов А.Т. – № 99115385/04. Заяв. 12.07.1999. Опубл. 20.07.2000.

69. Бета-каротин: принцип застосування, культивування мікроорганізмів, аналіз становища і перспектив у виробництві. – 2013. [Електронний ресурс] Режим доступу:

<https://knowledge.allbest.ru/biology/2c0b65625b3ad78a4c53a89421316d36.html>

70. Papadaki E., Mantzouridou F.T. Natural β-Carotene Production by *Blakeslea trispora* Cultivated in Spanish-Style Green Olive Processing Wastewaters. *Foods*. 2021, 10(2): 327.

71. Морфологія гриба *Blakeslea trispora*. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://bio-x.ru/articles/morfologiya-griba-blakeslea-trispora>

72. Вакуумна низькотемпературна барабанна сушарка BIORUSGV300. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://bio-rus.ru/oborudovanie/sushilka-barabannaya/>

73. Вакуумна сушарка з гребковою мішалкою. [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://www.czxf.cn/ru/1-14-vacuum-harrow-drying-machine.html>

74. Промислова проточна центрифуга СЕРА Z 101 / Z 101 GP. // БіоТехно. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://biotechno.ru/catalog/protochnye-tsentrifugi/promyshlennaya-protchnaya-tsentrifuga-сера-z-101/>

75. Стрічкові вакуумні фільтри. // ООО «КемИнС». [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.cesolutions.ru/production/obezvozhivanie_i_filtratsiya/lentochnye_vakuumnye_filtry/

76. Бондар І.В., Гуляєв В.М. Промислова харчова мікробіологія і агробіотехнологія. Дніпродзержинськ, видавництво ДДТУ, 2004. – 280 стор.

77. Процеси, апарати та устаткування виробництв галузі : конспект лекцій / укл. Давидюк Ю.М. – Чернівці : Чернівецький нац. ун-т, 2013. – Ч. II. Теплові процеси. – 128 с.

78. Пат. 2112808 RU. Способ получения кристаллического бета-каротина / Гаврилов А.С., Ивакин А.Ф., Медведева В.И., Панова Н.А., Зырянов В.В. Оpubл. 10.06.1998.

79. *Галушко І.А.* Біологія продуктивності сільськогосподарських тварин. – Миколаїв: МНАУ, 2017. – 163 с.

80. Бета-Каротин. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://russian.alibaba.com/product-detail/gmp-standard-high-quality-carotene-60643736189.html?spm=a2700.8699010.29.2.6e903aa4zCueea>

81. Дробарка валкова ДВГ 200X125. [Електронний ресурс] Режим доступу: http://vt-spб.ru/catalog/dlya_drobleniya_i_izmelcheniya/drobilka_valkovaya/drobilka_valkovaya_dvg_200kh125/

82. Гнучка упаковка для кормів і засобів для догляду за тваринами. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://gorapaketov.ru/gibkaya-upakovka/dlya-kormov-i-sredstv-dlya-uhoda-za-zhivotnymi/>

83. Автомат фасувально-пакувальний NP-SH1000 (зі шнековим дозатором). [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://packhouse.com.ua/p1343292742-avtomat-fasovochno-upakovochnyj.html>

84. Дозатор ваговий FOYER FZ-2000 вібрлотковий прямої дії. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://kozakplus.ua/products/granule-packaging-machines/fz-2000>

85. Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* – 1959. – №3. – P. 416–428.

86. Taylor K.L., Brackenridge A.E., Vivier M.A., Oberholster A. High-performance liquid chromatography profiling of the major carotenoids in *Arabidopsis thaliana* leaf tissue, *J. Chromatogr. A* 1121 (2006) 83–91.

87. Terol A, Paredes E, Maestre SE, Prats S, Todolí JL. 2012. Rapid and sensitive determination of carbohydrates in foods using high temperature liquid chromatography with evaporative light scattering detection: liquid chromatography. *J Sep Sci* 35: 929– 36. DOI:[10.1002/jssc.201101072](https://doi.org/10.1002/jssc.201101072).

88. Волова Т.Г. Биотехнология. – Новосибирск: Изд-во Сибирского отделения Российской Академии наук, 1999. – 252 с.
89. ОФС.1.4.1.0010.15 Порошки. // Фармакопея. [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://pharmacopoeia.ru/ofs-1-4-1-0010-15-poroshki/>
90. Jing K., He S., Chen T., Lu Y., & Ng I.-S. (2016). *Enhancing beta-carotene biosynthesis and gene transcriptional regulation in Blakeslea trispora with sodium acetate. Biochemical Engineering Journal, 114, 10–17.* doi:10.1016/j.bej.2016.06.015.
91. K.L. Taylor, A.E. Brackenridge, M.A. Vivier, A. Oberholster, High-performance liquid chromatography profiling of the major carotenoids in Arabidopsis thaliana leaf tissue, J. Chromatogr. A 1121 (2006) 83–91.