

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

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

«До захисту в ЕК»
Директор інституту (декан факультету)
Наталія ГРЕГІРЧАК
(підпис) (прізвище та ініціали)

« » лютого 2026 р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Віктор СТАБНІКОВ
(підпис) (прізвище та ініціали)

« » лютого 2026 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

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

освітньо-професійної програми

«Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»
на тему: Біосинтез ацетоїну *Corynebacterium glutamicum*

Виконав: здобувач 5 курсу, групи ЗБТ-5-1

КУЧЕРУК Михайл Андрійович
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник КРАСІНЬКО Вікторія Олегівна
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент ЗУРНАДЖАН Артур
(прізвище, і'мя) (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 – 2026 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 01 ” грудня 2025 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

КУЧЕРУКА Михайла Андрійовича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Біосинтез ацетоїну *Corynebacterium glutamicum*»
керівник роботи КРАСІНЬКО Вікторія Олегівна, доцент, к.т.н.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 28.11.2025 року № 957к

2. Строк подання здобувачем роботи 03.02.2026

3. Вихідні дані до роботи Штам-продуцент *Corynebacterium glutamicum* CGS 11. Геометричний об'єм ферментера 0,5 м³. Цільовий продукт - ацетоїн. Річна потужність виробництва - 140 кг. Коефіцієнт заповнення ферментера - 0,6.

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

5. Перелік графічного матеріалу

Апаратурна схема формату А1 - 1 аркуш

Технологічна схема формату А3 - 2 аркуш

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 грудня 2025 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Отримання завдання та підбір літератури	01.12.2025 – 04.12.2025	Виконано
2	Написання Розділу 1. Характеристика цільового продукту	05.12.2025 – 14.12.2025	Виконано
3	Написання Розділу 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	15.12.2025 – 24.12.2025	Виконано
4	Написання Розділу 3. Техніко-економічне обґрунтування	25.12.2025 – 04.01.2026	Виконано
5	Написання Розділу 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми	05.01.2026 – 14.01.2026	Виконано
6	Написання Розділу 5. Специфікація обладнання	15.01.2026 – 19.01.2026	Виконано
7	Написання Розділу 6. Опис технологічної схеми	20.01.2026 – 21.01.2026	Виконано
8	Написання Розділу 7. Основні етапи виділення та очищення	22.01.2026 – 23.01.2026	Виконано
9	Написання Розділу 8. Контроль виробництва	24.01.2026 – 25.01.2026	Виконано
10	Оформлення кваліфікаційної роботи	26.01.2026 – 28.01.2026	Виконано
11	Оформлення графічної частини	29.01.2026 – 30.01.2026	Виконано

Здобувач _____
(підпис)

Керівник роботи _____
(підпис)

Міхаїл КУЧЕРУК _____
(ім'я та прізвище)

Вікторія КРАСІНЬКО _____
(ім'я та прізвище)

ABSTRACT

In the qualification work, a technological and instrumental scheme for the biosynthesis of acetoin using *Corynebacterium glutamicum* CGS 11, a strain that synthesizes the product with a concentration of up to 102.45 g/l, was developed. Acetoin can be used in the food industry as a flavoring agent with a buttery taste, as well as in the pharmaceutical and cosmetic industries.

The estimated production capacity of the target product was 140 kg of acetoin per year. The technological scheme of acetoin biosynthesis includes auxiliary work (preparation of aeration air, preparation and sterilization of nutrient media, preparation of titrating agents and antifoam), as well as the technological process itself (three stages of growing seed material: in flasks on shakers, in inoculators with a volume of 5 l, 50 l, and 500 l) and biosynthesis in a fermenter with a volume of 5.0 m³ with a filling factor of 0.6. The scheme of acetoin isolation and purification is also given.

The qualification work consists of an introduction, eight chapters, a list of used literature (56 items), technological and apparatus schemes. The total volume of the work is 75 pages, 15 tables, 6 figures.

Keywords: *acetoin, Corynebacterium glutamicum, biosynthesis, submerged cultivation, technological scheme, apparatus scheme.*

РЕФЕРАТ

У кваліфікаційній роботі розроблено технологічну та апаратурну схеми біосинтезу ацетоїну за допомогою *Corynebacterium glutamicum* CGS 11 - штаму, який синтезує продукт з концентрацією до 102,45 г/л. Ацетоїн може застосовуватися у харчовій промисловості як ароматизатор з вершковим смаком, а також у фармацевтичній та косметичній галузях.

Розрахована потужність виробництва цільового продукту склала 140 кг ацетоїну на рік. Технологічна схема біосинтезу ацетоїну включає допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, підготовка і стерилізація поживних середовищ, приготування титрувальних агентів та піногасника), а також безпосередньо технологічний процес (три стадії вирощування посівного матеріалу: у колбах на качалках, в інокуляторах об'ємом 5 л, 50 л та 500 л) та біосинтез у ферментері об'ємом 5,0 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6. Також наведено схему виділення та очищення ацетоїну.

Кваліфікаційна робота складається зі вступу, восьми розділів, списку використаної літератури (56 найменувань), технологічної та апаратурної схем. Загальний обсяг роботи – 75 сторінок, 15 таблиць, 6 рисунків.

Ключові слова: ацетоїн, *Corynebacterium glutamicum*, біосинтез, глибинне культивування, технологічна схема, апаратурна схема.

ЗМІСТ

ABSTRACT.....	4
РЕФЕРАТ.....	5
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА АЦЕТОЇНУ ЯК ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ БІОСИНТЕЗУ	10
РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА ДЛЯ БІОСИНТЕЗУ АЦЕТОЇНУ	12
2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента	12
2.2. Перевірочний розрахунок по компонентам поживного середовища для культивування <i>Corynebacterium glutamicum</i> CGS11 з метою отримання ацетоїну	20
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	22
3.1. Розрахунок потреби у цільовому продукті ацетоїні	22
3.2. Обґрунтування потужності виробництва	26
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера.....	29
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	31
РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	33
4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	33
4.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря.....	35
4.3. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища	36
4.3.1. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках	36
4.3.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах.....	37
4.3.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу	39
4.4. Обґрунтування підготовки та стерилізації підживлювального розчину ..	40
4.5. Обґрунтування вибору титрувальних агентів для регуляції рН у процесі біосинтезу цільового продукту	42
4.6. Обґрунтування вибору піногасника.....	43
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	45
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА АЦЕТОЇНУ .	48
РОЗДІЛ 7. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ АЦЕТОЇНУ	56
7.1. Обґрунтування способу відділення культуральної рідини від біомаси	56

7.2. Попереднє очищення від високомолекулярних та забарвлених домішок	56
7.3. Вилучення та концентрування ацетоїну з культуральної рідини.....	57
7.4. Фінішне очищення та регенерація розчинника	57
7.5. Доведення до товарної форми та стабілізація	58
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	59
8.1. Мікробіологічний контроль	59
8.1.1. Висів на агаризовані поживні середовища.....	59
8.1.2. Мікроскопіювання	61
8.2. Технологічний контроль.....	62
8.2.1. Визначення концентрації біомаси	62
8.2.2. Визначення концентрації ацетоїну	63
8.2.3. Визначення концентрації джерела Карбону (глюкози) у середовищі	64
8.2.4. Визначення концентрації джерела Нітрогену (амінного азоту).....	65
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:	67

ВСТУП

Ацетоїн (3-гідрокси-2-бутанон) широко застосовують як натуральний «вершковий» ароматизатор у харчовій, фармацевтичній та косметичній галузях; його річний попит зростає разом із трендом на clean-label інгредієнти (Wikipedia contributors, 2024). Менш токсичний за споріднений діацетил, ацетоїн має статус GRAS у США та дозволений в ЄС за принципом quantum satis (European Parliament, & Council of the European Union, 2008; U.S. Food and Drug Administration, 2025). Найбільш економічний шлях його одержання - мікробна біоконверсія вуглеводних субстратів.

Серед відомих продуцентів перспективним є *Corynebacterium glutamicum* CGS 11, біоінженерний варіант якого синтезує до $102 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ ацетоїну за 62 год без значного накопичення побічного 2,3-бутандіолу (Lu et al., 2020). Висока продуктивність досягається завдяки нокауту побічних дегідрогеназ та перенаправленню потоку пірувату у ацетоїнову гілку. Разом із тим дикі та ранні рекомбінантні штами *C. glutamicum* потребують багатокомпонентних середовищ і підвищених потоків стерильного повітря $> 1 \text{ vvm}$, що збільшує собівартість продукту й ускладнює масштабування (Lu et al., 2020).

Україна імпортує ароматичний ацетоїн переважно з Китаю, тому створення вітчизняної біотехнології є важливим для продовольчої та технологічної безпеки країни (TrendEconomy, 2024). Оптимізація штаму CGS 11 під локальну сировину (кукурудзяний steep-ліквор, дріжджовий екстракт) і впровадження дробного підживлення глюкозою дають змогу знизити споживання кисню та скоротити енергетичні витрати на аерацію.

Метою цієї курсової роботи є проектування повної технологічної схеми біосинтезу ацетоїну з використанням штаму *C. glutamicum* CGS 11 у 5-м³ ферментері, масштабування підготовки поживного середовища та розроблення систем мікробіологічного та хімічного контролю.

					НУХТ БТЕК 05.01.27 КР ПЗ			
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Кучерук М.А.			ВСТУП	Літ.	Арк.	Аркушів
Консульт.							8	75
Керівник		Красінько В.О.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. кафедри		Стабніков В.П.						
								8

Новизна проєкту полягає у впровадженні штаму CGS 11 із блокованим побічним метаболізмом, двокомпонентного середовища без солей амонію, стратегії дробного підживлення глюкозою без подачі чистого O₂ та комбінованої системи контролю, що поєднує заливний посів і спектрофотометричний моніторинг ацетоїну, що дає можливість одержати підвищені концентрації ацетоїну у культуральній рідині 102 г/л (Lu et al., 2020).

РОЗДІЛ 1. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА АЦЕТОЇНУ ЯК ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ БІОСИНТЕЗУ

Цільовим продуктом є ацетоїн, який представляє собою безбарвну пахучу рідину, що виробляється бактеріями та генно-модифікованими дріжджами (Acetoin, 2025).

Органолептичні показники: безбарвна або світло-жовта рідина. Запах приємний, маслянистий, з нотками йогурту або вершкового масла; менш різкий, ніж у діацетилу, Смак: кремово-маслянистий, злегка солодкуватий, характерний для молочних продуктів (Acetoin, 2025).

Норми використання:

Європейський Союз (також Україна): Згідно з Регламентом (ЄС) № 1333/2008, ацетоїн дозволений для використання як ароматизатор у харчових продуктах за принципом *quantum satis*, тобто, в кількостях, необхідних для досягнення бажаного ефекту, без встановлення конкретного максимального рівня (Codex Alimentarius Commission, 1995).

Сполучені Штати Америки: Відповідно до 21 CFR § 184.1278, ацетоїн вважається загальноновизнаним як безпечний (GRAS) для використання в харчових продуктах як ароматизатор або допоміжна речовина без встановлення конкретних обмежень, за умови дотримання належної виробничої практики (U.S. Food and Drug Administration, 2025).

Фізико-хімічні властивості:

Назва IUPAC:

3-гідроксибутан-2-он

Інші назви: ацетилметилкарбінол,

3-гідрокси-2-бутанон

Хімічна формула: C₄H₈O₂ (рис. 1.1)

Молярна маса: 88.11 г/моль

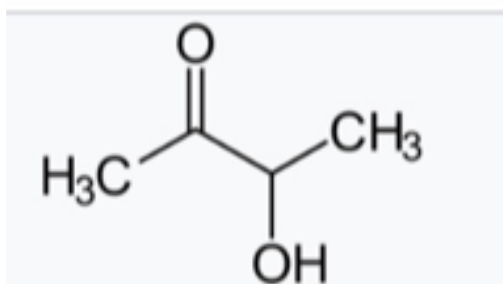


Рис 1.1. Хімічна формула ацетоїну (Acetoin., 2025).

					НУХТ БТЕК 05.01.27 КР ПЗ			
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Кучерук М.А.			РОЗДІЛ 1. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА АЦЕТОЇНУ ЯК ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ БІОСИНТЕЗУ	Літ.	Арк.	Аркушів
Консульт.							10	75
Керівник		Красінько В.О.				Кафедра БТМ 10		
Н. Контр.								
Зав. кафедри		Стабніков В.П.						

Густина: 1.013 г/мл при 25 °С

Температура плавлення: 15 °С (мономер), димер існує у вигляді білого кристалічного порошку з температурою плавлення 90 °С

Добре розчиняється у воді (1000 г/л при 20 °С), спиртах, пропіленгліколі, гліцерині.

Терміни та умови зберігання:

Ацетоїн зберігати за t° від +2°С до +6°С в сухому,

захищеному від прямих сонячних променів в герметичній тарі (рис. 1.2).

Склад: Ацетоїн 99% чистоти

Технологія біологічного синтезу ацетоїну:

Культивування генно-модифікованого біологічного агента при глибинній асептичній ферментації до досягнення прийнятної концентрації ацетоїну, або виснаження субстратів поживного середовища.

Сфера застосування:

Харчова промисловість: використовується як ароматизатор з маслянистим присмаком у випічці, молочних продуктах, цукерках та напоях.

Косметика та парфумерія: додається до кремів, лосьйонів та парфумів для надання вершкового аромату.

Фармацевтика: служить проміжною сполукою у синтезі деяких лікарських засобів (Li et al., 2023).

Виробництво електронних сигарет: використовується для створення ароматів з маслянистими або карамельними нотами (Ацетоїн (Acetoin), 2025).



Рис 1.2 Комерційне фото одного з виробників ацетоїну в Україні (Acetoin., 2025).

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА ДЛЯ БІОСИНТЕЗУ АЦЕТОЇНУ

2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента

Ацетоїн є важливим біохімікатом, який природним чином продукується бактеріями роду *Bacillus*, *Serratia*, *Klebsiella* та *Lactococcus* (Magee & Kosaric, 1987). Його біотехнологічне виробництво почалося у 1970-х роках із використанням *Lactococcus lactis* (Romano & Suzzi, 1996), а в 1980-х – із дослідженням *Bacillus subtilis* (Ryan & Kohlhaw, 1974). У 1996 році видалення гена *bdhA* у *B. subtilis* дозволило збільшити вихід ацетоїну до 96% від теоретичного максимуму (U.S. Food and Drug Administration, 2025). У 2000-х роках застосування *Klebsiella pneumoniae* дозволило отримати (R)-ацетоїн із таких вуглецевих джерел, як глюкоза, ксилоза та маніт (Ehsani et al., 2009).

З 2010-х років активно розвиваються методи генетичної модифікації: у 2012 році *Saccharomyces cerevisiae* був модифікований для ефективного синтезу ацетоїну, що дозволило досягти виходу 98,2% стереоспецифічності (Acetoin, 2025). У 2016 році вдосконалена *E. coli* продемонструвала продуктивність 60,3 г/л ацетоїну (Bae et al., 2016). У 2023 році використання рекомбінантної *E. coli* дозволило досягти 81.62 г/л (R)-ацетоїну (Ацетоїн (Acetoin), 2025). Сучасні дослідження зосереджені на зниженні вартості виробництва, підвищенні толерантності мікроорганізмів до ацетоїну та використанні низьковартісних субстратів, таких як відходи крохмалю та лігноцелюлоза (Chai et al., 2020; Wang et al., 2022), але вони не дивлячись на свою низьку стартову ціну потребують складного процесу гідролізу. Останні дослідження показали, що генно модифіковані *C. glutamicum* та *S. cerevisiae* було використані для досягнення концентрації ацетоїну в культуральній рідині вище 100 г/л (Lu et al., 2020; Bae et al., 2021).

В рамках цього дослідження, спираючись на наукову літературу, були проаналізовані штами мікроорганізмів, інженерно модифіковані для ефективного

					НУХТ БТЕК 05.01.27 КР ПЗ			
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Кучерук М.А.			Розділ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента для біосинтезу ацетоїну	Літ.	Арк.	Аркушів
Консульт.							12	75
Керівник		Красінько В.О.				Кафедра БТМ 12		
Н. Контр.								
Зав. кафедри		Стабніков В.П.						

синтезу цінних хімічних сполук. Особливу увагу було приділено штамам *Bacillus subtilis* ZB02, *Corynebacterium glutamicum* CGS9 та *Corynebacterium glutamicum* CGS11, оцінюючи їх потенціал для виробництва ацетоїну.

Bacillus subtilis ZB02: Згідно зі статтею Zhang B. et al. (2016), цей штам був сконструйований для виробництва ацетоїну шляхом одночасного використання глюкози, ксилози та арабінози. У ферментації з періодичною подачею субстрату штам ZB02 продемонстрував здатність накопичувати 62,2 г/л ацетоїну з середньою продуктивністю 0,864 г/л/год та виходом 0,29 г/г від загальної кількості цукрів. Важливою особливістю штаму є його здатність використовувати лігноцелюлозний гідролізат (що містив 20,6 г/л глюкози, 12,1 г/л ксилози та 0,45 г/л арабінози), продукуючи 11,2 г/л ацетоїну з виходом 0,34 г/г загального цукру в колбовій культурі протягом 30 годин. Хоча здатність утилізувати лігноцелюлозні субстрати є перевагою з точки зору використання дешевої сировини, складність попередньої обробки таких субстратів та потенційно нижчий титр порівняно з рафінованими цукрами можуть впливати на економічну доцільність у промислових масштабах.

Corynebacterium glutamicum CGS9: Цей штам, як описано у статті Lu et al. (2020), є продуцентом (3R)-ацетоїну і слугував вихідним штамом для подальших інженерних модифікацій, що призвели до створення CGS11. Сам CGS9, маючи три копії оперону *alsSD*, здатний продукувати 15,70 г/л (3R)-ацетоїну з глюкози з виходом 0,408 г/г протягом 34 годин у колбовій культурі. У статті Kou et al. (2022) штам CGS9 використовується як платформа для створення ефективних продуцентів оптично чистого. Таким чином, хоча CGS9 і продукує ацетоїн, його основна цінність в контексті статті Kou et al. (2022) полягає у його потенціалі як шасі для синтезу 2,3-бутандіолу. Як продуцент ацетоїну, він поступається як ZB02 (на змішаних цукрах), так і CGS11.

Corynebacterium glutamicum CGS11: Цей штам, детально описаний у статті Lu et al. (2020), є високопродуктивним продуцентом (3R)-ацетоїну, отриманим шляхом подальшої метаболічної інженерії штаму CGR6 (який, у свою чергу, є похідним CGS9). CGS11 продемонстрував видатні результати у ферментації з

періодичною подачею глюкози, досягнувши титру 102,45 г/л (3R)-ацетоїну з виходом 0,419 г/г та продуктивністю 1,86 г/л/год протягом 55 годин. Оптична чистота отриманого (3R)-ацетоїну перевищувала 95%.

Важливими перевагами є використання простого субстрату (глюкози) для мікроорганізму *C. glutamicum*, що спрощує його промислове застосування. Згідно з результатами порівняльного аналізу досліджених штамів на основі аналізу типу субстрату, тривалості культивування, титру, виходу та продуктивності цільового продукту, а також потенційної економічної доцільності, можна зробити наступні висновки. *Bacillus subtilis* ZB02 є перспективним для утилізації змішаних цукрів та лігноцелюлозних гідролізатів, що важливо для переробки відновлюваної біомаси, однак його титр ацетоїну нижчий порівняно з *C. glutamicum* CGS11. *Corynebacterium glutamicum* CGS9, хоча і продукує ацетоїн, є менш ефективним порівняно з іншими розглянутими штамми, але слугує важливою платформою для синтезу 2,3-бутандіолу його похідними. *Corynebacterium glutamicum* CGS11 демонструє найвищий титр (102,45 г/л), високий вихід (0,419 г/г) та продуктивність (1,86 г/л/год) оптично чистого (3R)-ацетоїну при використанні глюкози, що робить його найбільш доцільним біологічним агентом для промислового отримання (3R)-ацетоїну серед розглянутих варіантів.

Згідно результатів порівняльного аналізу різних надпродуцентів ацетоїну на основі аналізу тривалості культивування та виходу цільового продукту (таблиця 2.1), прорахування вартості поживного середовища (таблиця 2.2) та вирахування вартості граму ацетоїну з поживного середовища (таблиця 2.3) було вирішено, що *Corynebacterium glutamicum* CGS11 є більш доцільним БА для промислового отримання ацетоїну.

Особливості культивування біологічних агентів для біосинтезу ацетоїну

Біологічний агент	Поживне середовище		Час культивування год.	Концентрація ацетоїну г/л	Особливості культивування	Джерела
	Компонент	Концентрація г/л				
1	2		3	4	5	6
<i>B. subtilis</i> ZB02	Глюкоза D-ксилоза L-арабіноза Na ₂ HPO ₄ * KH ₂ PO ₄ * NaCl * NH ₄ Cl * MgSO ₄ * CaCl ₂ * Порошок кукурудзяного екстракту Триптофан	78 24 18 12,8 3 0,5 1,0 0,1204 г 0,01111 г 30 0,05	72	62.2	Температура 37°C, частота обертів перемішуючого пристрою 400 об/хв (використовувалися також 300 об/хв та 500 об/хв для порівняння), рН 7.0 (контроль рН за допомогою 1 М NaOH та 1 М H ₂ SO ₄), аерація 1 vvm. Початкова сумарна концентрація цукрів (суміш глюкози, ксилози та арабінози у співвідношенні 65:20:15) приблизно 120 г/л. Стратегія підживлення: коли концентрація глюкози знижувалася нижче 10 г/л, до ферментера додавали 100 г/л суміші цукрів.	Zhang, B., Li, X.-I., Fu, J., Li, N., Wang, Z., Tang, Y.-j., & Chen, T. (2016). Production of acetoin through simultaneous utilization of glucose, xylose, and arabinose by engineered <i>Bacillus subtilis</i> . <i>PLoS ONE</i> , 11(7), e0159298. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159298 * Склад мінімального поживного середовища M9 - Harwood CR, Cutting SM. <i>Molecular Biological Methods for Bacillus</i> . England: John Wiley & Sons Ltd; 1990

<i>Corynebacterium glutamicum</i> CGS11	Дріжджовий екстракт	10	62	102.45	рН 7, 30°C, аерація 1 об'єм повітря на 1 об'єм середовища в хвилину, швидкість мішалки 600 об/хв підтримання рівня глюкози шляхом підживлення (початкова концентрація 150 г/л, після чого концентрацію тримають між 10-50 г/л).	Lu, L., Mao, Y., Kou, M., Cui, Z., Jin, B., Chang, Z., ... & Chen, T. (2020). <i>Engineering central pathways for industrial-level (3 R)-acetoin biosynthesis in Corynebacterium glutamicum</i> . <i>Microbial Cell Factories</i> , 19, 1-16. (Lu et al., 2020)
	Кукурудзяний екстракт	50				
	Сечовина					
	K ₂ HPO ₄	1				
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5				
	Ацетат натрію	0.5				
Глюкоза	2					
		292				
<i>Corynebacterium glutamicum</i> CGS9	Дріжджовий екстракт	10	34	15.70	Штам <i>Corynebacterium glutamicum</i> CGS9 культивували періодично у колбах на роторному шейкері (220 об/хв) при температурі 30°C. Використовували поживне середовище CGXII з початковим рН 7.0 та стартовою концентрацією глюкози 38 g/L. Посівний матеріал вносили до досягнення початкової оптичної густини OD600 рівної 1.	Lu, L., Mao, Y., Kou, M., Cui, Z., Jin, B., Chang, Z., ... & Chen, T. (2020). <i>Engineering central pathways for industrial-level (3 R)-acetoin biosynthesis in Corynebacterium glutamicum</i> . <i>Microbial Cell Factories</i> , 19, 1-16. (Lu et al., 2020)
	(NH ₄) ₂ SO ₄	5				
	Сечовина	5				
	KH ₂ PO ₄	1				
	K ₂ HPO ₄	1				
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.25				
	CaCl ₂	0.01				
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01				
	MnSO ₄ ·H ₂ O	0.0001				
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.001				
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0002				
	NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.00002				
	Біотин	0.0004				
	Глюкоза	38				

Таблиця 2.2

Розрахунок вартості поживних середовищ для культивування з метою отримання ацетоїну біотехнологічним методом

Продуцент	Компоненти поживного середовища	Концентрація у ПС г/л,	Ціна компонента грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
<i>B. subtilis</i> ZB02	Глюкоза	78	46.8	3.6504	12
	D-ксилоза	24	586.5	14.076	13
	L-арабіноза	18	3000	54.000	14
	Na ₂ HPO ₄	12.8	99	1.267	4
	KH ₂ PO ₄	3	104	0.312	2
	NaCl	0.5	6.4	0.003	16
	NH ₄ Cl	1.0	33.6	0.034	5
	MgSO ₄	0.1204 г	29	0.003	8
	CaCl ₂	0.01111 г	18	0.0002	10
	Порошок кукурудзяного екстракту	30	74	2.22	11
	Триптофан	0.05	550	0.028	17
Загальна вартість 75.5936 грн за літр					
<i>Corynebacterium glutamicum</i> CGS9	Дріжджовий екстракт	10	703	7.03	1
	(NH ₄) ₂ SO ₄	5	18.6	0.093	6
	Сечовина	5	30.9	0.155	7
	KH ₂ PO ₄	1	104	0.104	2
	K ₂ HPO ₄	1	150	0.252	3
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.25	19.2	0.005	9
	CaCl ₂	0.01	18	0.0002	10
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01	27.6	0.0003	18
	MnSO ₄ · H ₂ O	0.0001	59	0.00001	9
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.001	90	0.00009	20
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.0002	166.2	0.00003	21
	NiCl ₂ · 6H ₂ O	0.00002	400	0.00001	22
	Біотин	0.0004	5150	0.0021	23
	Глюкоза	38	46.8	1.7784	12
Загальна вартість 9.4201 грн за літр					
<i>Corynebacterium glutamicum</i> CGS11	Дріжджовий екстракт	10	703	7.03	1
	Кукурудзяний екстракт	50	74	3.7	11
	Сечовина	1	30.9	0.0309	7
	K ₂ HPO ₄	0.5	150	0.075	1
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5	19.2	0.0141	9
	Ацетат натрію	2	95	0.19	15
	Глюкоза	292	46.8	13.7124	12
Загальна вартість 24.7524 грн за літр					

Примітка. *(ціни 2025 р.)

1. Дріжджовий екстракт - https://prom.ua/ua/p2429300269-drozhzhevoj-ekstrakt.html?utm_source=google_pmax&utm_medium=cpc&utm_content=pmax&utm_campaign=Pmax_spa_50_produkty_pitaniya
2. KH_2PO_4 (монокалій фосфат) - <https://him-component.com.ua/ua/p569679738-monokalijfosfat.html>
3. K_2HPO_4 (двокалій фосфат) - <https://novohim.com.ua/en/catalog/industrial-chemicals-and-raw-materials/potassium-phosphate-2-substituted/>
4. Na_2HPO_4 (динатрій фосфат, двозамісний) - <https://novohim.com.ua/ru/catalog/promyshlennaya-khimiya-i-syre/natrij-fosfornokislyj-2-zam/>
5. NH_4Cl (хлорид амонію) - <https://him-component.com.ua/ua/p1264620505-hlorid-ammoniya.html>
6. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (сульфат амонію) - <https://prom.ua/ua/Sulfat-ammoniya%3Bwholesale.html>
7. Сечовина (карбамід) - <https://harvest-house.com.ua/dobryvo-karbamid-sechovyna-25-kh/>
8. MgSO_4 (сульфат магнію, безводний) - <https://him-component.com.ua/ua/p594691540-sulfat-magniya.html>
9. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (сульфат магнію семиводний) - <https://novohim.com.ua/catalog/promislova-ximiya-j-sirovina/magnij-sirchanokislij-7-vodnij/>
10. CaCl_2 (хлорид кальцію) - <https://budforma.com/dobavki-v-beton/kaltsij-xloristyj/kaltsij-xlorid-uskoritel-tverdenija>
11. Кукурудзяний екстракт - <https://prom.ua/ua/p1310305542-ekstrakt-kukurudzyanij-litriv.html>
12. Глюкоза - <https://www.systopt.com.ua/item-glyukoza?variant=122>
13. D-Хилоза (ксілоза) - <https://shop.hlr.ua/ua/ksiloza-d-chda-98313.html>
14. L-Arabinose (арабіноза) - <https://phytotechlab.com/l-arabinose.html>
15. Ацетат натрію - https://primehim.com.ua/index.php?route=product/product&path=20&product_id=167
16. NaCl (хлорид натрію) - <https://kaapri.com.ua/p49246102-sol-tehnicheskaya-dlya.html>
17. L-Триптофан - <https://biotus.ua/ua/triptofan-l-tryptophan-now-foods-poroshok-57-gramm.html>
18. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (сульфат заліза семиводний) - <https://agrovinn.com.ua/sredstva-zashchity-rastenij-szr/fungicidy/zheleznyj-kuporos-25-kg>
19. $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (сульфат марганцю моногідрат) - <https://himfarinvest.com.ua/sulfat-marganca-uk>
20. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (сульфат цинку семиводний) - <https://mychem.in.ua/p1830467432-sulfat-tsinka-vodnyj.html>
21. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (сульфат міді пентагідрат) - <https://prom.ua/ua/p76425492-med-ternokislaya-sulfat.html>
22. $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (хлорид нікелю гексагідрат) - <https://atk-ua.com.ua/catalog/nikel-hlorid-geksagidrat-509/>

23. Біотин - https://bigl.ua/ua/p1990751085-vitamin-biotin-profiprot?utm_source=pmax&utm_medium=cpa&utm_content=ru&utm_campaign=top_sites_sell_ru&gad_source=1&gad_campaignid=21409225161&gbraid=0AAAAADiHIOR1JqPvALoFzypsq7X5Ez4I1&gclid=CjwKCAjwl_XBBhAUEiwAWK2hzrmHrYQejlCa_xvuLKvjCTayZng11B7CEXePb87e4Wh00zuOx5JxqRoC00QQA_vD_BwE

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г отриманого ацетоїну запропонованими біологічними агентами

Біологічний агент	Концентрація ацетоїну г/л	Тривалість культивування, год	Накопичення кінцевого продукту за год культивування	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 граму ацетоїну грн/г
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
<i>B. subtilis</i> ZB02	62.2	72	0.864	75.5936	0,82
<i>Corynebacterium glutamicum</i> CGS9	15.7	34	0.462	9.4201	0.60
<i>Corynebacterium glutamicum</i> CGS11	102.45	62	1.652	24.7524	0.24

Згідно *таблиці 2.3* можна побачити, що по швидкості накопичення кінцевого продукту, концентрацію кінцевого продукту та нижчу кінцеву вартість 1 г ацетоїну БА *Corynebacterium glutamicum* CGS11 є економічно вигіднішим серед усіх наведених штамів у таблиці.

2.2. Перевірочний розрахунок по компонентам поживного середовища для культивування *Corynebacterium glutamicum* CGS11 з метою отримання ацетоїну

Розрахунок концентрації карбону, що міститься в 1 літрі поживного середовища

Потреби для синтезу біомаси, згідно статті було отримано приблизно 27 г/л біомаси (рис 2.1): Як джерело вуглецю для синтезу біомаси та ацетоїну використовується глюкоза з загальним внесенням 292 г/л.

Оскільки масова частка карбону в глюкозі є 40%, то в 292 г глюкози ($292 * 0.4 = 116.8$) 116.8 г карбону. Частка карбону в біомасі 50%, то необхідно розрахувати скільки карбону в 27 г біомаси при тому враховуючи що 40% карбону пішло на холосте окислення. В 27 г біомаси знаходиться ($27 * 0.5 = 13.5$) 13.5 г карбону. Для синтезу цієї біомаси, ще 40% карбону пішло на холосте окислення, тобто 13.5 г карбону складає 60% від загального карбону, що витрачений на біомасу. Отже, загальний карбон, витрачений на синтез біомаси, становить ($13.5 / 0.60 = 22.5$) 22.5 г карбону.

На синтез ацетоїну залишається (116.8 г загального карбону - 22.5 г карбону на біомасу = 94.3) 94.3 г карбону.

Масова частка карбону в ацетоїні ($C_4H_8O_2$) складає приблизно 54.5% ($4 * 12.011 / 88.106$). Кінцева концентрація ацетоїну складала 102 г/л, тобто для синтезу 102 г ацетоїну необхідно ($102 * 0.545 = 55.59$) 55.6 г карбону.

Порівнюючи доступний карбон (94.3 г) з необхідним для синтезу ацетоїну (55.6 г), бачимо, що існує значний надлишок карбону ($94.3 - 55.6 = 38.7$ г). Це свідчить про те, що 292 г глюкози як джерела карбону є більш ніж достатньо для отримання 27 г біомаси та 102 г ацетоїну. У поживному середовищі також присутні інші компоненти, такі як кукурудзяний екстракт в кількості 50 г/л та дріжджовий екстракт у кількості 10 г/л, які є багатими на органічні та амінокислоти продукти.

Висновок: згідно перевірного розрахунку карбону, 292 г глюкози з надлишком вистачає для отримання 27 г біомаси та 102 г ацетоїну. Перевірочний

розрахунок нітрогену та фосфору не є доцільним, оскільки дріжджовий екстракт та кукурудзяний екстракт є джерелами азоту та фосфору у даному поживному середовищі і знаходяться там в досить високих концентраціях.

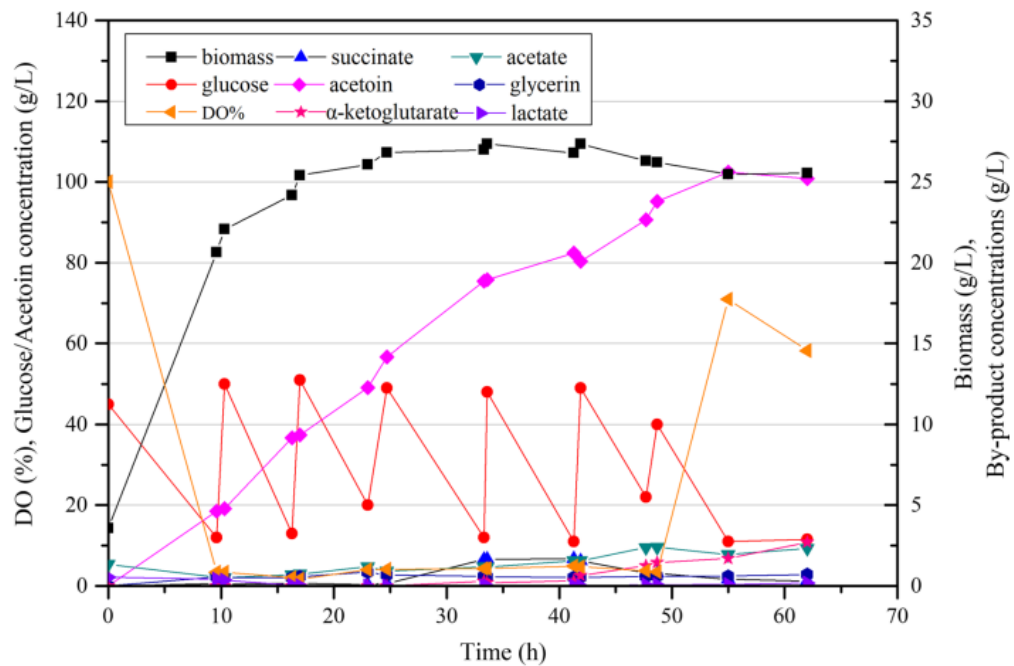


Рис. 2.1 Графік результатів ферментації *Corynebacterium glutamicum* CGS11 (Lu et al., 2020).

На графіку можна побачити, що концентрація глюкози доводилася до концентрації 45 г/л при падінні нижче за 10-15 г/л, також з графіку можна побачити, що культура *Corynebacterium glutamicum* CGS11, досить швидко набирала біомасу і досягла кінця експоненційної фази росту орієнтовно в межах 12-15 год, з подальшим виходом на плат, орієтовна максимальна концентрація біомаси становить 27 г/л. З досягненням стаціонарної фази розвитку культура, починається стрімке накопичення ацетоїну до інгібуючої концентрації яка починається орієнтовно з 100 г/л ацетоїну.

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Розрахунок потреби у цільовому продукті ацетоїні

Ацетоїн (3-гідрокси-2-бутанон) – органічна сполука, яка використовується як ароматизувальна речовина з характерним «вершково-масляним» профілем. Відповідно до Регламенту (ЄС) № 1334/2008, гармонізованого із законодавством України, ацетоїн дозволений до використання як ароматизатор без встановлення кількісних обмежень, що підтверджує його безпечність та стабільний попит (European Commission, 2008).

Офіційна публічна статистика Державної служби статистики України щодо обсягів споживання саме ацетоїну відсутня, оскільки ця сполука не виділяється в окрему категорію. У митній статистиці вона класифікується в групі УКТЗЕД 2914 40 - «кетоніві спирти та кетональдегіди». Аналіз даних імпорту за цією групою (HS-6 291440) показує, що у 2023 році обсяг поставок до України становив близько 66,5 тис. доларів США (The Observatory of Economic Complexity, 2025). Враховуючи світові ціни на ацетоїн, які коливаються в діапазоні від 15–25 \$/кг для синтетичного продукту до 50–110 \$/кг для натурального (food-grade), реалістична оцінка загального споживання ацетоїну в Україні становить 1–5 тонн на рік (Vigon International, 2025; made-in-China.com, 2025; ChemicalBook, 2025).

Основним споживачем ацетоїну є харчова промисловість, частка якої оцінюється у 70–90% від загального ринку. Інші галузі, такі як виробництво рідин для електронних сигарет, косметика та фармацевтика, займають значно менші частки. Попит у сегменті вейпінгу суттєво обмежується через законодавчу заборону на ароматизовані рідини в Україні, що набрала чинності у 2024 році (Львівський обласний центр контролю та профілактики хвороб МОЗ України, 2024). Таким чином, розрахунок потреби у цільовому продукті доцільно проводити на основі аналізу попиту в ключових галузях промисловості. Узагальнені дані для розрахунку річної потреби в ацетоїні наведені в табл. 3.1.

НУХТ БТЕК 05.01.27 КР ПЗ

Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Кучерук М.А.					
Консульт.						23	75
Керівник		Красінко В.О.					
Н. Контр.							
Зав. кафедри		Стабніков В.П.					

Розділ 3. Техніко-економічне
обґрунтування

Кафедра БТМ

Вихідні дані для розрахунку річної потреби в ацетоїні в Україні

Галузь застосування	Орієнтовна частка ринку, %	Річна потреба, кг
Харчова промисловість (молочні продукти, випічка, кондитерські вироби)	80	2800
Косметика та парфумерія	10	350
Фармацевтична промисловість	5	175
Рідини для електронних сигарет (залишкова/тіньова частка)	5	175
Всього	100	3500

Для подальшого розгляду, був обраний вузький напрямок у харчовій промисловості – випічці кондитерських виробів. У технології випічки ацетоїн застосовують у складі ароматизаторів та смакових композицій для формування вершкового/молочного відтінку, зокрема у виробках листкового тіста (круасани та споріднені здобні вироби) (Perflavory; The Good Scents Company).

Для техніко-економічного обґрунтування у даній курсовій роботі обрано напрям харчової промисловості – виробництво круасанів (лишкових здобних виробів) із застосуванням натурального ацетоїну як компонента ароматизатора.

Офіційної відкритої статистики щодо обсягів використання ацетоїну в Україні немає, тому потребу оцінювали опосередковано за статистикою випуску найбільш близької товарної категорії у Номенклатурі промислової продукції (НПП) ДССУ. Найбільш релевантним кодом НПП для круасанів є НПП 10.71.12.00.30 «Вироби здобні (булочки підвищеної калорійності, листкові, рулети з маком, рогаики тощо)» (періодичність – місячна/річна) (ДССУ, 2021).

Було проведено багатогранний пошук і аналіз джерел інформації та статистик у відкритому доступі, зокрема:

1) класифікація НПП для ідентифікації статистичного коду виробів (10.71.12.00.30) (ДССУ, 2021);

- 2) регіональні статистичні публікації щодо промислового випуску за кодом 10.71.12.00.30 (Чернігівська обл., Харківська та Херсонська обл. – річні дані за 2021 р (Чернігівстат, 2021; Харківстат, 2021.; Херсонстат, 2021.);
- 3) довідникові дані про типовий рівень застосування ацетоїну у baked goods (макс. 32 ppm) на основі FEMA (Flavor and Extract Manufacturers Association, провідна галузева асоціація США виробників ароматизаторів і екстрактів) (Perflavory);
- 4) міжнародні дані імпорту та цінові пропозиції постачальників як індикатори наявності ринку (ОЕС, 2025; Vigon International, 2025).

Таблиця 3.2

Публічні відкриті дані випуску виробів за кодом НПП 10.71.12.00.30 у вибраних областях України за 2021 рік.

Область	Період (публікація)	Випуск, т	Джерело (URL)
Чернігівська	2021 (річні дані)	6309,0	https://www.chernigivstat.gov.ua/statdani/promisl/P7_2021.htm
Харківська	2021 (річні дані)	5517,5	https://kh.ukrstat.gov.ua/index.php/vyrobnytstvo-osnovnykh-vydiv-promyslovoi-produktsii-schorichno
Херсонська	2021 (річні дані)	1317,5	https://ks.ukrstat.gov.ua/arkhiv-2021-roku/2615-virobnitstvo-promislovoji-produktsiji-za-vidami-u-2021-rotsi/8949-virobnitstvo-promislovoji-produktsiji-za-vidami-za-2021-rik.html

Примітка. НПП 10.71.12.00.30 включає листові здобні вироби, що технологічно відповідає групі, в яку входять і круасани, тому цей код використано для оцінювання обсягів виробництва круасанів у регіоні (ДССУ, 2021).

Розрахунок річної потреби в ацетоїні для круасанів виконано на основі даних Чернігівської області (як найбільш повні річні відкриті дані).

Вихідні дані для розрахунку:

$Q_{10.71.12.00.30} = 6309,0$ т/рік (Чернігівська обл., 2021) (Чернігівстат, 2021);

$D = 32$ мг/кг (максимальний рівень внесення для baked goods; використано як консервативну оцінку) (Perflavory).

Оскільки статистична категорія охоплює різні здобні вироби, для виділення сегмента круасанів та круасанів із «вершковим» профілем застосовано припущення (сценарне):

$s_{кр} = 0,25$ – частка круасанів у категорії 10.71.12.00.30;

$s_{вершк} = 0,60$ – частка круасанів, для яких використовується вершковий ароматизатор на основі ацетоїну. Коефіцієнт $s_{вершк} = 0,60$ прийнято як базовий сценарій частки круасанів, для яких формується вершково-масляний (“buttery/creamy”) сенсорний профіль за рахунок застосування вершкових/кремових ароматизаторів, що можуть включати ацетоїн як ключовий компонент. Вибір базового значення 0,60 ґрунтується на поєднанні даних ринкової сегментації «класичних» круасанів та технологічних практик використання масляно-кремових ароматизаторів у виробах типу “traditional croissant”. Беручи 0,50–0,55 як якірну частку «традиційних» круасанів (Emergen Research, 2025) і враховуючи, що масляно-кремові ароматизатори застосовуються також у кремових профілях/складових, пов’язаних з croissant-виробами (flavor.gr., 2025), базовий коефіцієнт прийнято на рівні $s_{вершк} = 0,60$ як консервативне припущення, що не зводить вершковий сегмент лише до “traditional croissants”, але й не завищує його до 0,7–0,8 за відсутності офіційних українських даних.

Тоді річна потреба в ацетоїні ($P_{ац}$, кг/рік) визначається:

$$P_{ац} = Q \cdot s_{кр} \cdot s_{вершк} \cdot D / 1000,$$

де Q – випуск за кодом НПП, т/рік; D – дозування, мг/кг;

$$P_{ац} = 6309,0 \cdot 0,25 \cdot 0,60 \cdot 32 / 1000 = 30,28 \text{ кг/рік.}$$

Отже, орієнтовна річна потреба у натуральному ацетоїні для сегмента круасанів у Чернігівській області становить близько 30,3 кг/рік (за базовим сценарієм). Для подальших розрахунків потужності виробництва прийнято

проектний попит на рівні 140 кг/рік, що відповідає забезпеченню попиту кількох суміжних областей з урахуванням резерву та сезонних коливань попиту.

3.2. Обґрунтування потужності виробництва

На сьогоднішній день промислове виробництво ацетоїну в Україні відсутнє. Потреби національного ринку повністю забезпечуються за рахунок імпорту. Основні постачальники - країни ЄС (Німеччина, Франція) та Китай. На ринку присутні дистриб'ютори, що пропонують як натуральний, так і синтетичний ацетоїн (Sigma-Aldrich (Merck), 2025), що свідчить про наявність стабільного, хоча й невеликого, попиту.

Таблиця 3.3.

Основні виробники ацетоїну за формою випуску, що імпортуються в Україну

Продукт (діюча речовина)	Форма випуску	Виробник (країна)	Джерело
Ацетоїн	рідина / порошок, natural	Advanced Biotech, США	(1)
Ацетоїн	рідина / порошок, natural	Aurochemicals, США	(2)
Ацетоїн (Acetyl Methyl Carbinol)	(звично) рідина, natural	Vigon International (Azelis Group), США	(3)
Ацетоїн (≥95%, FG)	рідина, food/fragrance grade	Merck / Sigma-Aldrich, Німеччина/США	(4)
Ацетоїн, 96% (димер)	порошок/кристали (Acros/ Thermo Scientific Chemicals)	Thermo Fisher Scientific, США/ЄС	(5)
Ацетоїн, >98% (може існувати як кристалічний димер)	кристалічний димер	TCI (Tokyo Chemical Industry), Японія/ЄС	(6)

Ацетоїн (powder)	Порошок/рідина	De Monchy Aromatics , Нідерланди/Велика Британія	(7)
Ацетоїн	форма не зазначена (промислові поставки; виробник ароматичних кетонів)	Yancheng Hongtai Bioengineering , Китай	(8)

Примітка. Імпортні форми ацетоїну, що доступні як на міжнародному, так і на українському ринках (станом на вересень 2025 року):

- 1) <https://adv-bio.com/acetoin-liquid-natural-1183/>;
- 2) <https://www.aurochemicals.com/product/acetoin-acetyl-methyl-carbinol-natural-liquid/>;
- 3) <https://www.vigon.com/product/acetyl-methyl-carbinol-natural-acetoin/>;
- 4) <https://www.sigmaaldrich.com/YE/en/product/aldrich/w200832>;
- 5) <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/411951000>;
- 6) <https://www.tcichemicals.com/US/en/p/H0225>;
- 7) <https://www.knowde.com/stores/de-monchy/products/de-monchy-acetoin-powder>;
- 8) https://www.hongtaibiochem.com/wap_products_detail_en/id/58.html;

Згідно з розрахунками, проведеними у підрозділі 3.1, базовий попит на ацетоїн для сегмента круасанів у Чернігівській області становить близько 30,3 кг/рік. Для подальших технологічних та економічних розрахунків у проєкті прийнято планову потужність виробництва 140 кг/рік, що відповідає забезпеченню попиту кількох суміжних областей та формуванню резерву на сезонні коливання попиту.

Отже, планова потужність виробництва ацетоїну становитиме:

30,28 кг/рік · 5 областей ≈ 151,4 кг/рік; для проєкту прийнято округлене значення 140 кг/рік.

Обраним біологічним агентом для біосинтезу є штам *Corynebacterium glutamicum CGS11*, який, згідно з даними, синтезує ацетоїн до кінцевої концентрації 102,45 г/л (або 102,45 кг/м³).

Процес виділення та очищення цільового продукту з культуральної рідини пов'язаний із технологічними втратами. Враховуючи, що ацетоїн є легкою та водорозчинною сполукою, процес його виділення (наприклад, дистиляцією чи екстракцією) є складним. Згідно з аналізом, сумарні втрати можуть становити 15–35%. Для даного проєкту приймаємо сумарні втрати цільового продукту при виділенні на рівні 35% (фільтрування та центрифугування $\approx 5\%$; хроматографічне очищення $\approx 25\%$; сушіння та фасування $\approx 5\%$).

Таким чином, для отримання 140 кг товарного продукту необхідно виробити більшу його кількість, що компенсує втрати. Об'єм культуральної рідини ($V_{\text{кр}}$), необхідний для отримання 140 кг ацетоїну, з урахуванням концентрації та втрат, становить:

1. Спочатку визначимо об'єм культуральної рідини (X), необхідний для отримання 140 кг ацетоїну без урахування втрат:

$$102,45 \text{ кг} - 1 \text{ м}^3$$

$$140 \text{ кг} - X \text{ м}^3$$

$$X = (140 \cdot 1) / 102,45 = 1,366 \approx 1,37 \text{ м}^3$$

2. Далі розрахуємо загальний об'єм культуральної рідини ($V_{\text{кр}}$), враховуючи, що 1,37 м³ становить 65% (100% - 35%) від необхідного об'єму:

$$1,37 \text{ м}^3 - 65\%$$

$$V_{\text{кр}} - 100\%$$

$$V_{\text{кр}} = (1,37 \cdot 100) / 65 = 2,11 \text{ м}^3$$

Отже, для забезпечення річної потужності виробництва на рівні 140 кг ацетоїну необхідно отримати 2,11 м³ культуральної рідини на рік.

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

Для визначення необхідного об'єму ферментаційного обладнання необхідно розрахувати об'єм культуральної рідини, що виробляється за один виробничий цикл. Цей розрахунок базується на річній потребі в культуральній рідині ($V_{\text{кр}}$), яка згідно з п. 3.2 становить 2,11 м³.

Розрахунковий об'єм є дуже малим для організації цілорічного виробництва (300-330 днів). Згідно з рекомендаціями, якщо визначений об'єм ферментатора є меншим за типові промислові значення, доцільно розглядати періодичне виробництво, зменшивши кількість робочих днів. Мінімальна кількість робочих днів для економічної доцільності проекту становить 30. Приймаємо кількість робочих днів на рік ($T_{\text{рд}}$) – 30 днів. В інші 300 днів на рік виробництво може використовуватися для випуску спорідненої мікробіологічної продукції: харчових ароматизаторів, органічних кислот, ферментних препаратів або барвників мікробного походження, залежно від ринкового попиту.

Спочатку розрахуємо об'єм культуральної рідини, який необхідно отримувати за добу ($V_{\text{д}}$):

$$V_{\text{д}} = V_{\text{кр}} / T_{\text{рд}} = 2,11 / 30 = 0,0703 \text{ м}^3/\text{добу}$$

Цикл роботи ферментера ($T_{\text{цф}}$) складається з часу безпосереднього культивування ($T_{\text{к}}$) та часу на проведення підготовчо-завершальних операцій ($T_{\text{пр}}$).

Тривалість біосинтезу ацетоїну штамом *Corynebacterium glutamicum CGS11* ($T_{\text{к}}$) становить 62 год.

Час підготовки ферментера ($T_{\text{пр}}$) включає наступні операції, норми для яких наведені в:

- Миття та огляд апарату – 1,5 год;
- Перевірка на герметичність – 1,0 год;
- Підігрів апарату – 0,5 год;
- Стерилізація апарату – 1,0 год;
- Охолодження апарату – 1,0 год;

- Завантаження середовища – 2,0 год;
- Засів – 0,5 год;
- Вивантаження культуральної рідини – 1,0 год.

Сумарний час на підготовчі операції ($T_{\text{ПР}}$) становить:

$$T_{\text{ПР}} = 1,5 + 1,0 + 0,5 + 1,0 + 1,0 + 2,0 + 0,5 + 1,0 = 8,5 \text{ год}$$

Таким чином, загальна тривалість циклу роботи ферментера ($T_{\text{ЦФ}}$) дорівнює:

$$T_{\text{ЦФ}} = T_{\text{К}} + T_{\text{ПР}} = 62 + 8,5 = 70,5 \text{ год}$$

Об'єм культуральної рідини за один цикл ($V_{\text{ЦК}}$) розраховується за формулою, що враховує коефіцієнт запасу (K_1), який приймаємо рівним 1,1 для компенсації втрат від нестерильних операцій:

$$V_{\text{ЦК}} = (K_1 \cdot V_{\text{Д}} \cdot T_{\text{ЦФ}}) / 24 = (1,1 \cdot 0,0703 \cdot 70,5) / 24 = 0,227 \text{ м}^3/\text{цикл}$$

Знаючи об'єм культуральної рідини за цикл та коефіцієнт заповнення ферментера ($K_{\text{зап}}$), визначаємо його необхідний геометричний об'єм ($V_{\text{ГФ}}$). Коефіцієнт заповнення для даного процесу становить 0,6.

$$V_{\text{ГФ}} = V_{\text{ЦК}} / K_{\text{зап}} = 0,227 / 0,6 = 0,378 \text{ м}^3$$

Розрахунковий геометричний об'єм ферментера становить 0,378 м³ (378 л). З огляду на стандартні ряди промислового обладнання для виробництв невеликого масштабу (пілотні установки), обираємо найближчий більший стандартний геометричний об'єм ферментера.

Таким чином, для проєкту приймаємо ферментер з геометричним об'ємом $V_{\text{ГФ}} = 0,5 \text{ м}^3$ (500 л).

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Виробничий біосинтез ацетоїну здійснюють у ферментері геометричним об'ємом ($V_{ГФ}$) $0,5 \text{ м}^3$ з коефіцієнтом заповнення ($K_{зап}$) $0,6$.

Робочий об'єм ферментера ($V_{РОБ}$) становить:

$$V_{РОБ} = V_{ГФ} \times K_{зап} = 0,5 \times 0,6 = 0,3 \text{ м}^3 (300 \text{ л})$$

Кількість посівного матеріалу (інокуляту) для виробничого ферментера становить 10% від об'єму поживного середовища. Отже, для одержання 300 л культуральної рідини потрібно:

$$V_{РОБ.1} = 300 \text{ л} \times 0,1 = 30 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Таку кількість інокуляту готують у посівному апараті (інокуляторі). Розрахуємо його геометричний об'єм ($V_{ІН1}$), приймаючи коефіцієнт заповнення $K_{зап} = 0,6$:

$$V_{ІН1} = V_{РОБ.1} / K_{зап} = 30 / 0,6 = 50 \text{ л} (0,05 \text{ м}^3).$$

Для одержання 30 л культуральної рідини в першому інокуляторі потрібно мати:

$$V_{РОБ.2} = 30 \text{ л} \times 0,1 = 3 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Приготування такої кількості інокуляту здійснюють у другому, меншому інокуляторі. Його геометричний об'єм ($V_{ІН2}$) становитиме:

$$V_{ІН2} = V_{РОБ.2} / K_{зап} = 3 / 0,6 = 5 \text{ л} (0,005 \text{ м}^3).$$

Для одержання 3 л культуральної рідини в другому інокуляторі потрібно мати:

$$V_{РОБ.3} = 3 \text{ л} \times 0,1 = 0,3 \text{ л} (300 \text{ мл}) \text{ посівного матеріалу.}$$

Таку кількість інокуляту отримують культивуванням у колбах на качалці. Для цього використовують дві колби об'ємом 750 мл зі 150 мл середовища в кожній.

Висновки щодо кількості стадій підготовки посівного матеріалу, об'ємів ферментаційного обладнання та об'ємів води для підготовки поживного середовища на всіх етапах процесу наведено у табл. 3.4.

Таблиця 3.4

Результати розрахунку об'ємів ферментаційного обладнання для підготовки посівного матеріалу і виробничого біосинтезу

Об'єм ферментера, м³	Коефіцієнт заповнення	Робочий об'єм ферментера (об'єм середовища), м³ (л)	Об'єм посівного матеріалу (10%), м³ (л)	Конденсат (10%)	Об'єм води для приготування композицій середовища, м³ (л)
0,5	0,6	0,3 (300)	0,03 (30)	0,03 (30)	0,24 (240)
0,05 (50 л)	0,6	0,03 (30)	0,003 (3)	0,003 (3)	0,024 (24)
0,005 (5 л)	0,6	0,003 (3)	0,0003 (0,3)	0,0003 (0,3)	0,0024 (2,4)
0,0003 (2x750 мл)	0,2	0,0003 (0,3)	-	-	0,0003 (0,3)

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 0,5 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у чотири етапи (включаючи виробничу стадію). Кількість стадій підготовки інокуляту становить три.

РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Corynebacterium glutamicum – є мезофільною (опт. температура 30°C), нейтралофільною (опт. рН 6.8-7.2), грампозитивною, облігантно аеробною рухливою бактерією, що найчастіше використовується для промислового синтезу амінокислот (TrendEconomy, 2024).

Зважаючи на властивості біологічного агента, можна зробити висновок про обов'язковість проведення культивування в умовах асептики. *Corynebacterium glutamicum*, як і більшість бактеріальних культур, може легко контамінуватися сторонньою мікрофлорою за умов, подібних до зазначених умов культивування. Контамінація є критично важливим фактором контролю, оскільки знижує якість та концентрацію цільового продукту - ацетоїну, що прямо впливає на ефективність виробничого процесу, оскільки культура-контамінант буде споживати частину ростового субстрату, що зменшить кількість біомаси *Corynebacterium glutamicum* та зменшить вихід ацетоїну.

Культивування планується проводити глибинним методом, оскільки саме цей спосіб дозволяє забезпечити стабільні асептичні умови та максимальну ефективність росту накопичення кінцевого продукту, також цей метод дозволяє проводити підживлення глюкозою за максимальною ефективністю, оскільки під час глибинного культивування можна контролювати процес масообміну у ферментері.

Асептичність процесу буде забезпечена стерилізацією обладнання, трубопроводів, поживного середовища та піногасників.

Культивування планується здійснювати під підвищеним тиском для кращого контролю герметичності всієї системи.

Оснащення для культивування *Corynebacterium glutamicum* повинно відповідати таким вимогам:

					НУХТ БТЕК 05.01.27 КР ПЗ			
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Кучерук М.А.			Розділ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми	Літ.	Арк.	Аркцив
Консульт.							34	75
Керівник		Красінько В.О.				Кафедра БТМ 33		
Н. Контр.								
Зав. кафедри		Стабніков В.П.						

Corynebacterium glutamicum є облігатним аеробом, тому необхідною є наявність системи подачі стерильного повітря та барботера для інтенсивної аерації.

Оскільки *C. glutamicum* в процесі культивування може змінювати рН середовища, підтримка нейтрального рівня рН (6.8–7.2) є критично важливою для забезпечення оптимального росту та синтезу амінокислот. Для цього необхідна можливість стерильного внесення розчинів-титрантів для корекції рН.

Для постійного моніторингу процесу культивування ферментер має бути оснащений системою стерильного відбору проб.

Контроль фізико-хімічних параметрів, таких як рН, концентрація розчиненого кисню, а також температури, є обов'язковим. Тому ферментер має містити відповідні сенсори та термосорочку для підтримання стабільної температури культивування на рівні 37°C.

Оскільки у процесі росту *Corynebacterium glutamicum* відбувається під інтенсивною аерацією та утворенням CO₂, необхідною є наявність патрубків для відведення відпрацьованого повітря та системи безперервної подачі стерильного повітря через барботер.

З огляду на необхідність підтримання асептичних умов, ферментер повинен бути герметичним, мати сорочку та корпус здатні витримувати підвищений тиск для подачі в сорочку глухої пари та можливість підведення гострої пари через барботер для процесу стерилізації.

Оскільки середовище для вирощування *C. glutamicum* включає компоненти, що сприяють піноутворенню, а саме кукурудзяний та дріжджовий екстракти, важливою є можливість стерильного додавання піногасника у концентрації 1% від загального об'єму.

Загалом ферментер має бути обладнаний наступними комунікаціями: сорочкою підвищеного тиску, ємністю підвищеного тиску, окремі комунікації, що стерилізуються: подача інокуляту, подача розчину глюкози, подача піногасника, подача лугу для контролю рН, подача кислоти для контролю рН.

4.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря

Продуцент *Corynebacterium glutamicum* є облігатним аеробом, що потребує постійної наявності розчиненого кисню в середовищі для забезпечення процесів життєдіяльності та біосинтезу цільового продукту - ацетоїну (Lu L., et al, 2020). Нестача кисню може призвести до пригнічення росту культури, зміни метаболічних шляхів або повної зупинки синтезу продукту. Тому технологічна схема повинна передбачати надійну систему підготовки та подачі стерильного повітря.

Враховуючи вимоги до асептики біотехнологічного виробництва, атмосферне повітря перед подачею у ферментер повинно пройти багатоступеневу очистку від механічних домішок, вологи та мікроорганізмів. Підготовка повітря здійснюється на компресорній станції та безпосередньо у виробничому цеху.

Процес підготовки аераційного повітря включає наступні стадії:

1. **Забір повітря.** Здійснюється через повітрозабірну трубу, підняту над рівнем даху будівлі (на висоті 15–18 м від землі), де концентрація пилу та мікроорганізмів є мінімальною. Вхідний отвір захищається жалюзійними решітками або сітками для запобігання потраплянню птахів та великого сміття.
2. **Попередня очистка.** Повітря проходить через масляні або рукавні фільтри для видалення грубодисперсних механічних часток пилу розміром понад 5–10 мкм. Це захищає компресорне обладнання від абразивного зносу.
3. **Стиснення повітря.** Очищене від пилу повітря стискається компресором до надлишкового тиску 0,3–0,5 МПа, необхідного для подолання гідростатичного тиску стовпа рідини у ферментері та опору фільтрів. У процесі стиснення температура повітря підвищується до 120–160 °С, що сприяє частковій загибелі мікрофлори, але не гарантує повної стерильності.
4. **Охолодження та вологовидалення.** Гаряче повітря охолоджується у теплообмінниках до температури 25–30 °С. При цьому відбувається конденсація водяної пари, яка разом із залишками мастила (від компресора) видаляється через вологомасловідокремлювач.

5. **Нагрівання повітря.** Перед подачею на фільтри тонкої очистки повітря підігрівають на 10–15 °С (до 40–50 °С) у теплообміннику. Це необхідно для зниження відносної вологості повітря ("підсушування"), що запобігає зволоженню фільтруючих матеріалів і проростанню мікрофлори крізь них.

6. **Головна очистка.** Повітря проходить через головний фільтр (попередній фільтр тонкої очистки), який затримує 95–98% дрібних часток та мікроорганізмів.

7. **Індивідуальна стерилізація.** Безпосередньо перед входом у ферментер повітря проходить через індивідуальний стерилізуючий фільтр (патронний фільтр з мембраною з розміром пор 0,22 мкм), що забезпечує ефективність очистки 99,999% і гарантує надходження у біореактор стерильного повітря.

4.3. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища

Для культивування *Corynebacterium glutamicum* CGS11 на стадії виробничого біосинтезу використовується поживне середовище наступного складу (г/л): глюкоза - 50,0 (початкова; уся: 292 г/л); дріжджовий екстракт - 10,0; кукурудзяний екстракт - 50,0; сечовина - 1,0; K_2HPO_4 - 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5; ацетат натрію - 2,0 (Lu L., et al, 2020).

Враховуючи наявність у складі середовища термолабільних компонентів (глюкоза, амінокислоти дріжджового та кукурудзяного екстрактів), які при спільній стерилізації з солями можуть вступати в реакцію Майяра з утворенням токсичних меланоїдинів, підготовку середовища проводять роздільно. Компоненти розділяють на композиції (А, Б), які стерилізують окремо і змішують безпосередньо у ферментері або інокуляторі.

4.3.1. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках

Для вирощування посівного матеріалу в колбах використовується середовище з глюкозою, дріжджовим екстрактом, триптоном та NaCl. Загальний об'єм середовища для двох колб становить 300 мл (0,3 л). Стерилізація проводиться в автоклаві.

Компоненти розділяють на дві композиції:

- **Композиція А:** Глюкоза, триптон, дріжджовий екстракт (термолабільні).

Режим стерилізації: 112 °С, 20 хв, 0,05 МПа.

- **Композиція Б:** NaCl (термостабільна сіль). Режим стерилізації: 131 °С, 30

хв, 0,15 МПа.

Таблиця 4.1. Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 300 мл середовища, г	Композиція	Об'єм води та компонентів, V, мл
Глюкоза	20,0	6,0	А	250
Дріжджовий екстракт	10,0	3,0		
Триптон	10,0	3,0		
Дистильована вода	-	-		
NaCl	2,5	0,75	Б	50
Дистильована вода	-	-		
Загальний об'єм, мл				300

4.3.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 5 л

Для цього етапу необхідно підготувати 2,7 л поживного середовища.

Стерилізація здійснюється безпосередньо в інокуляторі для композиції А.

Таблиця 4.2. Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 5 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 2,4 л середовища, г	Композиція	Об'єм води та компонентів, V, л
Глюкоза	20,0	48,0	А	2,0
Дріжджовий екстракт	10,0	24,0		
Триптон	10,0	24,0		
Питна вода	-	1,8		
Конденсат (10%)	-	0,2		
NaCl	2,5	6,0	Б	0,7
Питна вода	-	0,7		
Загальний об'єм, л				2,7

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 50 л

Для цього етапу необхідно підготувати 27 л поживного середовища.

Таблиця 4.3. Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 50 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 24 л середовища, г	Композиція	Об'єм води та компонентів, V, л
Глюкоза	20,0	480,0	А	2,4
Дріжджовий екстракт	10,0	240,0		
Триптон	10,0	240,0		
Питна вода	-	2,16		
Конденсат (10%)	-	0,24		
NaCl	2,5	60,0	Б	0,5

Питна вода	-	0,5		
Загальний об'єм, л				27,0*

*- буде додано через лічильник води до інокулятора ще 24,1 л питної води для стерилізації композиції Б у самому інокуляторі

4.3.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу

Виробничий біосинтез здійснюється у ферментері об'ємом 500 л. Необхідний об'єм поживного середовища (без урахування інокуляту) становить 270 л. Враховуючи порівняно невеликий об'єм, стерилізацію доцільно проводити у самому ферментері та реакторі-стерилізаторі для різних композицій.

Компоненти розділяють на дві основні композиції для початкового завантаження:

- **Композиція А (Органічна):** Глюкоза, дріжджовий екстракт, кукурудзяний екстракт. Стерилізується при 112 °С.
- **Композиція Б (Сольова):** Сечовина, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ацетат натрію. Стерилізується при 131 °С.

Примітка: Композиція В (розчин підживлення глюкозою) готується окремо і розглядається у підрозділі 4.3.

Таблиця 4.4. Склад композицій для стерилізації поживного середовища для культивування у виробничому ферментері

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 240 л середовища, кг	Композиція	Об'єм води та компонентів, V, л
Глюкоза	50,0	12,00	А	66
Дріжджовий екстракт	10,0	2,40		
Кукурудзяний екстракт	50,0	12,00		

Питна вода	-	59,4		
Конденсат (10%)	-	6,6		
Сечовина	1,0	0,24	Б	131,4
KH ₂ PO ₄	0,5	0,12		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5	0,12		
Ацетат натрію	2,0	0,48		
Питна вода	-	118,26		
Конденсат (10%)	-	13,14		
Загальний об'єм, л				

4.4. Обґрунтування підготовки та стерилізації підживлювального розчину

Технологічна схема передбачає режим культивування з підживленням (fed-batch). Це зумовлено необхідністю досягнення високої концентрації біомаси та цільового продукту (ацетоїну) без пригнічення росту культури високими початковими концентраціями субстрату (ефект Кребтрі).

Згідно з технологічними розрахунками, сумарна потреба в глюкозі для досягнення цільових показників біосинтезу становить 292 г/л (у перерахунку на кінцевий об'єм культуральної рідини). Початкова концентрація глюкози в основному середовищі становить 50 г/л. Отже, кількість глюкози, яку необхідно внести з підживленням, становить:

$$292 \text{ г/л} - 50 \text{ г/л} = 242 \text{ г/л.}$$

Розрахунок об'ємів та водного балансу

Робочий об'єм виробничого ферментера становить **300 л** ($V_{\text{роб}} = 500 \text{ л} \times 0,6$). Об'єм посівного матеріалу (інокуляту) становить **30 л** (10%).

1. Розрахунок кількості глюкози для підживлення:

$$M_{\text{глюкози}} = 242 \text{ г/л} \times 300 \text{ л} = 72\,600 \text{ г} = 72,6 \text{ кг.}$$

2. **Розрахунок об'єму підживлювального розчину (Композиція В):** Для мінімізації розбавлення культуральної рідини використовується висококонцентрований сироп глюкози - **1000 г/л** (1 кг глюкози в 1 л розчину).

$$V_{\text{підживлення}} = \frac{72,6 \text{ кг}}{1,0 \text{ кг/л}} = 72,6 \text{ л.}$$

3. **Коригування об'єму початкового поживного середовища (Композиції А і Б):** Щоб утримати кінцевий робочий об'єм у межах 300 л, необхідно зменшити кількість води при приготуванні початкового середовища.

$$V_{\text{кінцевий}} = V_{\text{середовища}} + V_{\text{інокуляту}} + V_{\text{підживлення}}$$

$$300 \text{ л} = V_{\text{середовища}} + 30 \text{ л} + 72,6 \text{ л}$$

$$V_{\text{середовища}} = 300 - 30 - 72,6 = 197,4 \text{ л.}$$

Висновок: Об'єм початкового середовища (Композиції А + Б) у підрозділі 2.2.3 має бути скоригований з 270 л до **197,4 л** (за рахунок зменшення кількості води).

Підживлювальний розчин (Композиція В) готується в окремому реакторі. Враховуючи високу в'язкість та концентрацію, розчинення проводять при нагріванні і постійному перемішуванні для попередження кристалізування глюкози. Стерилізація глюкозного сиропу здійснюється окремо в м'якому режимі (112 °С) для запобігання карамелізації.

Таблиця 4.5. Склад композиції В (підживлювальний розчин) для виробничого біосинтезу

Компонент	Вміст у розчині, г/л	Кількість для приготування 72,6 л розчину, кг	Композиція	Об'єм води та компонентів, V, л
Глюкоза кристалічна	1000	72,6	В	46,5*
Питна вода	-	23,5		
Конденсат (10%)	-	2,6		

Загальний об'єм, л		72,6
---------------------------	--	-------------

*Примітка: Враховано, що 72,6 кг глюкози займають певний об'єм при розчиненні (густина розчину $\approx 1,36$ кг/л). Об'єм води розраховано як різницю між цільовим об'ємом та об'ємом, витісненим сухою речовиною.

4.5. Обґрунтування вибору титрувальних агентів для регуляції рН у процесі біосинтезу цільового продукту

Оптимальний рівень рН для росту *Corynebacterium glutamicum* та біосинтезу ацетоїну знаходиться в межах **6,8–7,2** (Lu L., et al, 2020). Під час культивування у ферментері, автори зазначили, що не використовували титрувальні агенти для корекції рівня рН, оскільки:

1. У статті прямо підкреслено, що рекордний титр 102,45 г/л (3R)-ацетоїну отримано в *простому, «green»-процесі без дорогих добавок чи субстратів* – саме це є концепцією всього біопроцесу. Додавання лугів/кислот для корекції рН створювало б додаткові солі, витрати й стоки, тобто суперечило б задекларованому підходу «без дорогих добавок»
2. Авторам достатньо було задати початковий рН 6,5–7,0; далі «під час культивування значення рН не контролювали», але штам CGS11 у ферментері все одно досяг 102,45 г/л ацетоїну з виходом 0,419 г/г глюкози, при цьому концентрації органічних кислот-побічних продуктів (ацетат, сукцинат, лактат) залишалися низькими. Це означає, що середовище з фосфатними буферами, дріжджовим екстрактом і кукурудзяним екстрактом само стабілізує рН у придатному для *C. glutamicum* діапазоні, і додаткове титрування не потрібне.

Для підтримання рН на заданому рівні використовують розчини кислот та лугів для приготування поживного середовища для виробничого культивування:

- Як підлужнюючий агент обрано **NaOH** (гідроксид натрію), використовується після стерилізації сольової композиції Б.

- Як підкислюючий агент обрано **HCl** (соляну кислоту), використовується до стерилізації сольової композиції Б для зниження рівня рН до 4,0-4,5 для уникнення утворення осадів магній-фосфатних солей.

Розрахунок потреби в титрувальних агентах для стерилізації сольової композиції

Згідно з технологічними даними, питома витрата титрувальних агентів становить **2 мл на 1 л** поживного середовища.

1. Стадія: Виробничий ферментер 500 л

- Об'єм середовища (робочий): 300 л.
- Потреба в розчині: $300 \text{ л} \times 2 \text{ мл/л} = 600 \text{ мл} = 0,6 \text{ л}$.

Таблиця 4.6. Розрахунок потреби в титрувальних агентах

Стадія процесу	Об'єм середовища, л	Агент	Концентрація агента, %	Розрахований об'єм розчину, л (мл)
Ферментер 500 л	300,0	NaOH / HCl	6	0,6

Оскільки розраховані об'єми розчинів є дуже малими, їх приготування та стерилізація здійснюються в лабораторних умовах у скляному посуді (колбах), після чого вони асептично подаються до ферментера.

4.6. Обґрунтування вибору піногасника

Поживне середовище для культивування *Corynebacterium glutamicum* містить значну кількість піноутворюючих компонентів, зокрема кукурудзяний екстракт (50 г/л) та дріжджовий екстракт (10 г/л). Ці компоненти багаті на білки, пептиди та поверхнево-активні речовини, які при інтенсивній аерації (необхідній для облігатного аероба) сприяють утворенню стійкої піни.

Неконтрольоване піноутворення може призвести до:

- Втрати культуральної рідини через систему відведення газів.
- Зволоження фільтрів тонкої очистки повітря на виході, що створює ризик контамінації.
- Порушення масообміну кисню.

Для запобігання цьому процесу обрано хімічний метод піногасіння з використанням силіконового піногасника **XIAMETER® AFE-1510 Antifoam Emulsion** (Силікан, 2025). Цей агент є інертним, термостабільним та ефективним у широкому діапазоні рН.

Згідно з даними, необхідна концентрація піногасника становить 1% від об'єму середовища.

Розрахунок потреби у піногаснику

1. Стадія: Інокулятор 5 л

- Об'єм середовища: 3,0 л.
- Об'єм піногасника: $3,0 \text{ л} \times 0,01 = 0,03 \text{ л} = 30 \text{ мл}$.

2. Стадія: Інокулятор 50 л

- Об'єм середовища: 30 л.
- Об'єм піногасника: $30 \text{ л} \times 0,01 = 0,30 \text{ л} = 300 \text{ мл}$.

3. Стадія: Виробничий ферментер 500 л

- Робочий об'єм: 300 л.
- Об'єм піногасника: $300 \text{ л} \times 0,01 = 3,0 \text{ л}$.

Таблиця 4.7. Розрахунок потреби у піногаснику

Етап виробництва	Піногасник	Необхідний об'єм, л	Обладнання для приготування
Інокулятор 5 л	XIAMETER® AFE-1510	0,03	Колба 50 мл
Інокулятор 50 л	XIAMETER® AFE-1510	0,3	Колба 500 мл
Ферментер 500 л	XIAMETER® AFE-1510	3,0	Колба 5 л

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 5.1. Специфікація основного технологічного обладнання

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
ІН-1	Інокулятор	1	<p>Матеріал: Нержавіюча сталь SUS316L (контактні частини). Об'єм: Загальний 5 л. Оснащення: Сорочка, пропелерна мішалка (0–460 об/хв), порти для датчиків рН/DO/t. Параметри: Тиск -0,1...0,3 МПа, темп. -120...260 °С. Потужність 0,12 кВт. Габарити: 450×480×1500 мм. Виробник: Zhengzhou Laboao Instrument Equipment Co., Ltd. (Китай) (LABOAO, 2025).</p>
РС-2	Реактор-стерилізатор для комп. А	1	<p style="text-align: center;">Матеріал: AISI 316L. Об'єм: 5 л. Оснащення: Сорочка нагріву/охолодження, вакуумне ущільнення, мішалка (гомогенізатор). Параметри: тиск у робочій камері -1...+1 бар; у сорочці до 4 бар; потужність приводу ≈1,55 кВт. Виробник: ВЕСОМІХ / Comquima Europe (Іспанія). (Comquima Europe, 2025).</p>

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.27 КР ПЗ</i>		
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 5. Специфікація обладнання		
Розроб.		Кучерук М.А.					
Консульт.							
Керівник		Красінько В.О.					
Н. Контр.							
Зав. кафедри		Стабніков В.П.					
					Літ.	Арк.	Аркциів
						46	75
Кафедра БТМ						45	

<p>ПН-3</p>	<p>Насос перистальтичний</p>	<p>1</p>	<p>Найменування: Перистальтичний насос Watson-Marlow 530 (серія 500)</p> <p>Матеріал: Змочувані частини - змінна трубка (Marprene®, Bioprene®, Pumpsil® тощо);</p> <p>Параметри: Продуктивність 0,004 мл/хв – 3,5 л/хв (з головкою 520R2/REL, чого достатньо для дозування до 5-літрового стерилізатора); швидкість обертання 0,1–220 об/хв; максимальний тиск до 2 бар (520REL).</p> <p>Виробник: Watson-Marlow Fluid Technology Solutions (Велика Британія). (Watson-Marlow Fluid Technology Solutions, 2025).</p>
<p>ІН-4</p>	<p>Інокулятор</p>	<p>1</p>	<p>Матеріал: Нержавіюча сталь SUS316L. Об'єм: Загальний 50 л. Оснащення: Сорочка, пропелерна мішалка з частотним регулюванням (0–460 об/хв), оглядове скло, 8 портів на кришці. Параметри: Тиск -0,1...0,3 МПа. Потужність 0,20 кВт.</p> <p>Габарити: 580×580×2100 мм. Виробник: Zhengzhou Laboao Instrument Equipment Co., Ltd. (Китай) (LABOAO, 2025).</p>
<p>РС-5</p>	<p>Реактор-стерилізатор комп. А</p>	<p>1</p>	<p>Матеріал: AISI 316 (корпус), нержавіюча сталь (сорочка).</p> <p>Об'єм: 110 л.</p> <p>Оснащення: Сорочка для нагрівання/охолодження, вакуумне виконання, верхній люк.</p> <p>Параметри: Тиск у корпусі до 60 psi (≈4,1 бар); тиск у сорочці до 90 psi (≈6,2 бар); робочий об'єм</p>

			<p>110 л (≈ 30 gal); габарити посудини орієнтовно $\approx \text{Ø}610 \times 406$ мм.</p> <p>Виробник: Lee Industries (США). (Surplus Record, 2025).</p>
ПН-6	Насос перистальтичний	1	<p>Матеріал: Головка DZ45, силіконова трубка.</p> <p>Характеристики: Продуктивність 1,0–30 л/хв (регульована), точність $< \pm 0,5\%$. Керування: 0.1–300 об/хв, підтримка MODBUS. Потужність: < 300 Вт. Виробник: Aurora Pro Scientific LLC (США/Китай) (Aurora Pro Scientific LLC, 2025).</p>
РС-7	Реактор-стерилізатор для підживлюючого розчину глюкози	1	<p>Матеріал: AISI 316L (дзеркальне полірування).</p> <p>Об'єм: 125 л. Оснащення: Сорочка (67,7 л), трилопатева пропелерна мішалка, мобільна рама.</p> <p>Параметри: Тиск -1...3 бар. Робоча температура до 80 °С. Виробник: Tecnic Process Equipment Manufacturing (Іспанія) (Tecnic Process Equipment Manufacturing S.L.U., 2020).</p>
Н-8	Насос мембранний	1	<p>Матеріал: AISI 316 (проточна частина), PTFE (мембрана). Характеристики: Продуктивність до 30 л/хв (1,8 м³/год), напір до 70 м. Самовсмоктування. Габарити: 171×177×120 мм.</p> <p>Виробник: DEBEM srl (Італія) (DEBEM srl, 2025).</p>
ФР-9	Виробничий ферментер	1	<p>Матеріал: AISI 316L. Об'єм: 500 л. Оснащення: Сорочка, теплоізоляція, верхній привід Turrax з двома мішалками, конічне дно. Параметри: Тиск корпусу 1,5 бар, сорочки 3 бар. Потужність 6,25 кВт, 2850 об/хв. Габарити: 1,4×1,1×2,2 м.</p> <p>Виробник: SOFAST (Іспанія) (Comquima, 2025).</p>

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА АЦЕТОЇНУ

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

На даному етапі передбачається використання спеціалізованого обладнання для забору атмосферного повітря - повітрозабірника, конструктивно виконаного у вигляді вертикальної труби, оснащеної захисною решіткою. Ця решітка запобігає потраплянню великих механічних часток, птахів та сміття. Забір повітря здійснюється на висоті 6 метрів, де концентрація пилу та мікроорганізмів є мінімальною.

ДР 1.2. Очищення повітря від грубих домішок

Атмосферне повітря (від ДР 1.1), яке подається через повітрозабірник, надходить на стадію грубого очищення у фільтрах, де здійснюється видалення крупнодисперсних механічних домішок. Ефективність затримання завислих частинок є 85 %, що забезпечує вилучення частинок розміром від 10 до 50 мкм та захищає компресорне обладнання.

ДР 1.3. Стиснення повітря

Після очищення повітря на фільтрах грубого очищення (від ДР 1.2), воно надходить до компресора, де здійснюється стискання до надлишкового тиску 0,35 МПа. Крім того, внаслідок адіабатичного стиснення повітря характеризується підвищеною температурою (120-200 °С), що сприяє частковій інактивації мікрофлори.

ДР 1.4. Охолодження повітря і видалення вологи

Маючи високу температуру після компресора, повітря (від ДР 1.3) потребує охолодження для подальшого очищення. Для цього встановлюється теплообмінник промислового типу, за допомогою якого повітря охолоджується до температури 25–30 °С. При цьому відбувається конденсація водяної пари, яка видаляється через вологомасловідокремлювач.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Охоложене повітря (від ДР 1.4) далі проходить через нагрівач стисненого

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.27 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Кучерук М.А.</i>			<i>Розділ 6. Опис технологічної схеми виробництва ацетоїну</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркцив</i>
<i>Консульт.</i>							49	75
<i>Керівник</i>		<i>Красінько В.О.</i>				Кафедра БТМ		
<i>Н. Контр.</i>						48		
<i>Зав. кафедри</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

повітря з метою підігріву на (до 45–50 °С). Це необхідно для зниження відносної вологості повітря, що запобігає зволоженню фільтруючих матеріалів на наступних стадіях тонкої очистки та проростанню крізь них мікрофлори.

ДР 1.6. Очищення повітря у головному фільтрі

Підігріте та стабілізоване повітря (від ДР 1.5) подається у фільтри головного очищення - патронні фільтри, в яких у якості фільтрувального матеріалу використовується міроскловолокло. На даному етапі забезпечується 95% ступінь очищення повітря, відбувається затримка частинок розміром 0,5 мкм і більше.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Практично очищене повітря (від ДР 1.6) від фільтрів головного очищення надходить до фільтрів індивідуального очищення, які встановлюються безпосередньо перед інокуляторами (ІН-1, ІН-4) та ферментером (ФР-9). Забезпечення максимального ступеня очищення здійснюється за участю індивідуальних стерилізуючих фільтрів (мембранних з розміром пор 0,22 мкм), що мають ефективність очищення 99,999% і гарантують надходження стерильного повітря в асептичну зону.

ДР 2. Приготування титрувальних розчинів кислот і лугу

ДР 2.1. Приготування 6% розчину HCl для підкислення поживного середовища об'ємом 500 л

Для приготування 600 мл 6%-го розчину соляної кислоти у скляну ємність об'ємом 1 л вносять за допомогою мірного циліндра 470 мл дистильованої води і при постійному перемішуванні обережно додають 130 мл концентрованої (36%) соляної кислоти. Отриманий розчин закривають.

ДР 2.2. Приготування 6% розчину NaOH

ДР 2.2.1. Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH для підлужнення поживного середовища у ферментері об'ємом 500 л

На технічних вагах зважують 36 г кристалічного гідроксиду натрію. Наважку поміщають у термостійку колбу на 1,5 л і додають 600 мл дистильованої

води, перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві при температурі 121 °С і тиску 0,1 МПа протягом 20 хв. Охолоджений розчин використовують для корекції рН поживного середовища у ферментері.

ДР 3. Приготування і стерилізація запасних розчинів

ДР 3.1. Приготування та стерилізація розчину піногасника для інокулятора об'ємом 5 л

Як піногасник використовують емульсію XIAMETER® AFE-1510. Для приготування робочого розчину в колбу об'ємом 50 мл вносять 24 мл піногасника. Колбу закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С протягом 40 хв за тиску 0,15 МПа.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація розчину піногасника для інокулятора об'ємом 50 л

Для приготування робочого розчину в колбу об'ємом 500 мл вносять 240 мл піногасника XIAMETER® AFE-1510. Колбу закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С протягом 40 хв за тиску 0,15 МПа.

ДР 3.3. Приготування та стерилізація розчину піногасника для ферментера об'ємом 500 л

Для приготування робочого розчину в колбу об'ємом 5 літрів вносять 3,0 л піногасника XIAMETER® AFE-1510. Стерилізацію проводять при температурі 131 °С протягом 40 хв за тиску 0,15 МПа. Подача у ферментер здійснюється автоматично за сигналом датчика рівня піни.

ДР 4. Приготування та стерилізація розчину підживлення глюкозою

ДР 4.1. Приготування та стерилізація розчину підживлення глюкозою для ферментера об'ємом 500 л

У реактор-стерилізатор (РС-7) об'ємом 125 л подають 23,5 л питної води та нагрівають до температури 60–70 °С. При постійному перемішуванні вносять 72,6 кг кристалічної глюкози. Перемішування продовжують до повного

розчинення кристалів. Отриманий сироп (загальний об'єм 72,6 л, концентрація 1000 г/л) стерилізують у реакторі при температурі 112 °С протягом 20 хв за тиску 0,05 МПа. Після стерилізації розчин охолоджують до 60 °С і зберігають при цій температурі для запобігання кристалізації та забезпечення текучості при подачі у ферментер.

ДР 5. Приготування і стерилізація поживних середовищ

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

ДР 5.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 6,0 г глюкози, 3,0 г дріжджового екстракту та 3,0 г триптоні. Наважки поміщають у колбу об'ємом 500 мл, додають за допомогою мірного циліндра 250 мл дистильованої води, перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 112 °С, 0,05 МПа протягом 20 хв.

ДР 5.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 0,75 г NaCl. Наважку поміщають у колбу об'ємом 100 мл, додають за допомогою мірного циліндра 50 мл дистильованої води, перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 131 °С, 0,15 МПа протягом 40 хв.

ДР 5.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 5 л

ДР 5.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 48,0 г глюкози, 24,0 г дріжджового екстракту та 24,0 г триптоні. Наважки розчиняють у 2,0 л питної води у скляній ємності об'ємом 3 л на гарячій водяній бані, перемішують та вливають до ІН-1. Отриманий розчин стерилізують в інокуляторі при 112 °С, 0,05 МПа протягом 20 хв.

ДР 5.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 6,0 г NaCl. Наважку розчиняють у 0,7 л питної води, переносять у колбу об'ємом, герметизують і стерилізують в автоклаві при 131 °С, 0,15 МПа протягом 40 хв.

ДР 5.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 50 л

ДР 5.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 480 г глюкози, 240 г дріжджового екстракту та 240 г триптоні. Наважки переносять у реактор-стерилізатор (РС-2) на 5 л, додають 2,4 л питної води, вмикають перемішуючий пристрій та подають у сорочку глуху пару і після повного розчинення, стерилізують у реакторі при 112 °С, 0,05 МПа протягом 20 хв. Отриманий розчин подають до інокулятора (ІН-4) перистальтичним насосом (ПН-3).

ДР 5.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 60 г NaCl. Наважку розчиняють у 0,5 л питної води у колбі об'ємом 1 л. Через лічильник води у інокулятор (ІН-4) подають 24,1 літрів питної води, вносять отриманий розчин композиції Б з колби, перемішують і стерилізують в інокуляторі (ІН-4) при 131 °С, 0,15 МПа протягом 40 хв.

ДР 5.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування культури у ферментері об'ємом 500 л

ДР 5.4.1. Приготування і стерилізація композиції А

На ваговому дозаторі зважують 12,0 кг глюкози, 2,4 кг дріжджового екстракту та 12,0 кг кукурудзяного екстракту. Наважки переносять у реактор-стерилізатор (РС-5) на 110 л, додають через лічильник 66 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій. Для кращого розчинення компонентів у сорочку реактора подають пару. Отриманий розчин стерилізують у реакторі при 112 °С, 0,05 МПа протягом 20 хв. Після охолодження до 30 °С асептично перекачують перистальтичним насосом (ПН-6) у виробничий ферментер (ФР-9).

ДР 5.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 0,24 кг сечовини, 0,12 кг K_2HPO_4 , 0,12 кг $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ та 0,48 кг ацетату натрію. Наважки розчиняють у 3 л питної води у трьох скляних ємностях по 2 літри. Після розчинення, переносять безпосередньо до виробничого ферментера (ФР-9) і додають питну воду через лічильник води (128,4 л) до загального об'єму композиції Б та доводять рН (від ДР 2.1.1) до 4,0-4,5. Стерилізують у виробничому ферментері при 131 °С, 0,15 МПа протягом 40 хв.

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу

*ТП 6.1. Підтримання колекційної культури *Corynebacterium glutamicum* CGS11*

Бактерії *Corynebacterium glutamicum* CGS11 зберігають як колекційну культуру на скошеному агаризованому середовищі ВНІ (Brain Heart Infusion) у пробірках при температурі 4 ± 2 °С в холодильнику. Пересіви здійснюють раз у 2-3 місяці для підтримання життєздатності та стабільності властивостей штаму. Всі маніпуляції проводять в асептичних умовах ламінарного боксу.

ТП 6.2. Одержання робочої культури на агаризованому середовищі

Для отримання робочої культури використовують чашки Петрі з агаризованим середовищем ВНІ. Бактеріологічною петлею здійснюють пересів з колекційної пробірки на поверхню агару методом виснаженого штриха для одержання ізольованих колоній. Чашки інкубують у термостаті при 30 ± 1 °С протягом 24–48 годин.

ТП 6.3. Вирощування чистої культури на агаризованому середовищі у пробірках

Ізольовані колонії з чашок Петрі пересівають у 2 пробірки з агаризованим поживним середовищем (ВНІ). Культивують у термостаті при 30 ± 1 °С протягом 24 годин.

ТП 6.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

Стерильні композиції А і Б (від ДР 5.1.1 та ДР 5.1.2) асептично об'єднують. У дві колби об'ємом 750 мл вносять по 150 мл готового середовища. Інокують вмістом пробірок (від ТП 6.3). Колби встановлюють на качалку (180–220 об/хв) і культивують при 30 ± 1 °С протягом 24 годин.

ТП 6.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 5 л

У стерильний інокулятор (ІН-1) з композицією А (від ДР 5.2.1) асептично вносять стерильну композицію Б (від ДР 5.2.2). Встановлюють температуру 30 ± 1 °С. Вносять посівний матеріал з колб (від ТП 6.4) у кількості 300 мл (10% від об'єму). Культивування проводять при аерації 1 vvm та перемішуванні (500-600 об/хв.) протягом 24 годин. Проби на концентрацію біомаси (за теоретичним розрахунком, має вийти $\approx 11,83$ г/л біомаси) під час культивування відбирають кожні 6 год.

ТП 6.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 50 л

У стерильний інокулятор (ІН-4) з композицією А (від ДР 5.3.1) вносять стерильну композицію Б (від ДР 5.3.2). Встановлюють параметри: температура 30 ± 1 °С. Асептично перекачують посівний матеріал з інокулятора ІН-1 (від ТП 6.5) у кількості 3,0 л. Процес вирощування триває 24 години при інтенсивній аерації та перемішуванні (500-600 об/хв.). Проби на концентрацію біомаси (за теоретичним розрахунком, має вийти $\approx 11,83$ г/л біомаси) під час культивування відбирають кожні 6 год.

ТП 7. Виробничий біосинтез ацетоїну

ТП 7.1. Виробничий біосинтез у виробничому ферментері об'ємом 500 л

У підготовлений виробничий ферментер (ФР-9) з простерилізованою композицією Б (від ДР 5.4.2), асептично перекачують охолоджену композицію А (від ДР 5.4.1) перистальчним насосом (ІН-6) і доводять від ДР 2.2.1 6% розчином NaOH рН середовища до значення 7. Вмикають мішалку (600 об/хв) та подачу стерильного повітря (1 vvm). Встановлюють температуру 30 ± 1 °С. Подається піногасник автоматично за сигналом датчика рівня піни (від ДР 3.3). Після стабілізації параметрів здійснюють засів, перекачуючи через трубу перетичкування вміст інокулятора ІН-4 (30 л) у виробничий ферментер. Процес культивування ведеться у режимі з підживленням (fed-batch). Початкова концентрація глюкози становить 50 г/л. При зниженні концентрації глюкози до 10–15 г/л, вмикають мембранний насос (Н-8) для подачі стерильного розчину підживлення (від ДР 4.1). Підживлення здійснюють дробно для підтримання

концентрації глюкози в оптимальному діапазоні, запобігаючи її вичерпанню та надлишку. Загальна тривалість ферментації становить 62 години. Проби на концентрацію біомаси (за теоретичним розрахунком, має вийти $\approx 11,83$ г/л біомаси) під час культивування відбирають кожні 6 год. Кінцева концентрація ацетоїну досягає 102–103 г/л (102,45 г/л). Після завершення процесу культуральну рідину охолоджують і перекачують насосом на стадію виділення продукту.

РОЗДІЛ 7. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ АЦЕТОЇНУ

Ацетоїн (3-гідрокси-2-бутанон) є цінною біохімічною сполукою, а використання штаму *Corynebacterium glutamicum* дозволяє отримувати високі концентрації продукту з високою оптичною чистотою (3R)-ацетоїну (Lu, Mao, Kou, et al., 2020). Після завершення ферментації цільовий продукт знаходиться у складній багатокомпонентній системі, що містить клітинну біомасу, залишкові компоненти поживного середовища, білки, полісахариди, солі та побічні продукти метаболізму. Висока розчинність ацетоїну у воді ускладнює його енергоефективне вилучення, що зумовлює необхідність застосування багатостадійної схеми виділення та очищення, кожен етап якої має бути технологічно та економічно обґрунтованим (Fu, Li, Sun, & Xie, 2021).

7.1. Обґрунтування способу відділення культуральної рідини від біомаси

Першим і обов'язковим етапом є відокремлення нерозчинних компонентів, насамперед клітин *C. glutamicum* та інших грубодисперсних частинок. Їх присутність може погіршити масообмін на подальших стадіях, сприяти утворенню емульсій та збільшити витрати реагентів. Найбільш поширеними методами є центрифугування та мембранна мікрофільтрація. Центрифугування характеризується простотою апаратурного оформлення та легкістю масштабування, що робить його доцільним як базову операцію для освітлення ферментаційного бульйону (Taiwo, Madzimbamuto, & Ojumu, 2025). Мембранна мікрофільтрація, у свою чергу, може слугувати як альтернативою, так і додатковою стадією після центрифугування, забезпечуючи високу прозорість фільтрату, що є критичним для подальших рідинно-рідинних систем розділення (Fu et al., 2021).

7.2. Попереднє очищення від високомолекулярних та забарвлених домішок

Після відділення біомаси доцільно видалити розчинені високомолекулярні сполуки (білки, екзополісахариди), пігменти та колоїдні частинки.

					НУХТ БТЕК 05.01.27 КР ПЗ			
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Кучерук М.А.			Розділ 7. Основні етапи виділення та очищення ацетоїну	Літ.	Арк.	Аркушів
Консульт.							57	75
Керівник		Красінько В.О.				Кафедра БТМ 56		
Н. Контр.								
Зав. кафедри		Стабніков В.П.						

Це підвищує селективність вилучення ацетоїну та знижує ризик утворення стійких емульсій. Для цього можуть застосовуватися ультрафільтрація, що дозволяє відокремити білки та полімери, пропускаючи низькомолекулярний ацетоїн у пермеат, або адсорбційна обробка активованим вугіллям для знебарвлення розчину. Попереднє очищення є особливо важливим для технологій на основі висолювання, оскільки склад водної фази безпосередньо впливає на фазову рівновагу та ефективність розподілу цільового продукту (Fu et al., 2021).

7.3. Вилучення та концентрування ацетоїну з культуральної рідини

Враховуючи високу енергоємність випарювання великих об'ємів води, для первинного концентрування ацетоїну перевага надається екстракційним методам. Одним з найбільш технологічно привабливих підходів є екстракція з висолюванням (Salting-out extraction, SOE). Метод полягає у додаванні неорганічних солей (наприклад, фосфатів) для створення двофазної системи, що виштовхує ацетоїн з водної фази. Дослідження показали, що система етилацетат + K_2HPO_4 дозволяє ефективно вилучати ацетоїн, одночасно видаляючи залишкові цукри та органічні кислоти (Dai, Zhang, Li, & Xiu, 2017). Альтернативним зеленим методом є надкритична CO_2 -екстракція, яка дозволяє досягти відновлення продукту на рівні ~78% та мінімізувати залишки органічних розчинників, що важливо для харчових застосувань (Taiwo et al., 2025). Однак, зважаючи на простоту масштабування та менші капітальні витрати, SOE є пріоритетним методом для промислового виробництва.

7.4. Фінішне очищення та регенерація розчинника

Ключовим етапом після екстракції є фінішне очищення ацетоїну та відновлення екстрагенту. Оскільки ацетоїн є термічно чутливою сполукою, а для енантіомерно збагаченого продукту існує ризик погіршення оптичної чистоти при нагріванні (Taiwo et al., 2025), технологічно доцільно застосовувати вакуумну фракційну дистиляцію. Цей метод дозволяє знизити температуру кипіння компонентів суміші, що мінімізує термічну деградацію продукту та дозволяє отримати товарну фракцію ацетоїну з високою чистотою. Комбінація

екстракційного вилучення та вакуумної дистиляції є підтвердженим шляхом для доведення продукту до високих показників якості (Zhang, Yang, Wu, et al., 2022). У випадку використання схеми SOE, процес також включає стадію регенерації етилацетату для його повторного використання у циклі.

7.5. Доведення до товарної форми та стабілізація

Завершальним етапом є доведення очищеного ацетоїну до вимог специфікації, що включає контроль масової частки основної речовини, вмісту вологи та залишкових розчинників. Після вакуумної ректифікації, за необхідності, може застосовуватися дегазація або вакуум-стрипінг для видалення слідів летких домішок. Оскільки для *C. glutamicum* перспективним є виробництво енантімерно збагаченого (3R)-ацетоїну, система контролю якості повинна включати визначення оптичної чистоти як одного з ключових показників (Lu et al., 2020). Після підтвердження відповідності всім показникам якості продукт направляють на герметичне фасування та зберігання.

Таким чином, порівняльний аналіз можливих методів виділення та очищення ацетоїну свідчить, що поєднання центрифугування (або мікрофільтрації), екстракції з висолюванням (SOE), вакуумної ректифікації та фінального осушення є найбільш науково обґрунтованою та технологічно доцільною схемою. Запропонований підхід забезпечує отримання ацетоїну високої чистоти та може бути адаптований як для лабораторного, так і для промислового масштабу виробництва (Fu et al., 2021).

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Ефективність та відтворюваність біопроцесу напряму залежать від двох критичних точок: перша – це стерильність поживного середовища перед внесенням посівного матеріалу, друга – це фенотипова чистота виробничої культури *Corynebacterium glutamicum* CGS11 протягом усього культивування. Будь-яка стороння мікрофлора здатна знизити продуктивність, змінити технологічні параметри або призвести до браку всієї партії.

Тому в даному розділі подано методики контролю мікробіологічних та хімічних показників ферментації. Що стосується мікробіологічних показників культивування, то перша - це класичний заливний посів 1 мл середовища на агаризоване поживне середовище для виявлення та накопичення бактерій (МПА) та для виявлення грибів та дріжджів (СА) із паралельною експрес-мікроскопією краплі, що дозволяє підтвердити стерильність за 30 год і вже через кілька хвилин виявляти грубу контамінацію. Друга - контроль чистоти культури: морфологічна ідентифікація клітин *C. glutamicum*, опис типової колонії та висів на МПА.

8.1. Мікробіологічний контроль

8.1.1. Висів на агаризовані поживні середовища

Цей метод є "золотим стандартом" для підтвердження стерильності середовищ та чистоти культури. Він базується на здатності мікроорганізмів утворювати видимі колонії на щільних поживних середовищах.

Поживні середовища:

- М'ясо-пептонний агар (МПА) для аеробних бактерій.
- Сусло-агар (СА) для дріжджів і грибів.

Послідовність: Розплавлене агаризоване середовище після стерилізації розливається по чашкам Петрі в умовах ламінарного боксу та залишається на остигання до повного затвердіння агару. 1 мл простерилізованого поживного середовища висівається на іншу чашку з вже готовим МПА та СА для контролю стерильності новоприготовленого агару.

НУХТ БТЕК 05.01.27 КР ПЗ

Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Кучерук М.А.			Розділ 8. Контроль виробництва	Літ.	Арк.	Аркушів
Консульт.							60	75
Керівник		Красінько В.О.				Кафедра БТМ 59		
Н. Контр.								
Зав. кафедри		Стабніков В.П.						

Перевірка стерильності середовищ

Пробу стерильного поживного середовища, відібрану в стерильну пробірку або колбу, ретельно перемішують. Стерильною піпеткою відбирають 1 мл поживного середовища та переносять в чашку на агар з МПА та в чашку на агар з СА, розподіляють рівномірно шпателем Дригальського. Після цього перевертають чашки кришкою вниз та ставлять в термостат:

- Для бактерій (МПА/ВНІ): 37 ± 1 °С.
- Для грибів та дріжджів (СА): 24–26 °С (або 30 °С).

Чашки перевіряються кожні 10–12 годин. Якщо при досягненні 48 год культивування чашки залишилися без ознак росту мікроорганізмів, вважається, що на даному етапі процесу контамінації не виявлено (ріст повинен бути відсутній) (Пирог Т.П., Антонюк М.М, 2016).

Перевірка мікробіологічної чистоти біологічного агента

Для контролю чистоти культури *Corynebacterium glutamicum* CGS11 відбирають пробу культуральної рідини. Виснаженим штрихом в асептичних умовах висівають на чашки Петрі з агаризованим середовищем (МПА). Інкубують у термостаті при оптимальній температурі для продуцента (30 ± 1 °С) протягом 24–48 годин.

Результат: На чашках повинні вирости лише типові колонії *C. glutamicum*. На багатих середовищах (ВНІ, МПА) *C. glutamicum* утворює невеликі до середніх колоній (діаметр 1–2 мм), які є чітко відмежованими, округлими, з рівними краями. Колір колоній варіює від кремового до блідо-жовтого, поверхня гладка, блискуча, профіль опуклий. З віком культури (до 5 діб) колонії можуть набувати більш насиченого жовтого забарвлення через накопичення каротиноїдного пігменту декапреноксантину (Sumi et al., 2019; Messelink et al., 2021).

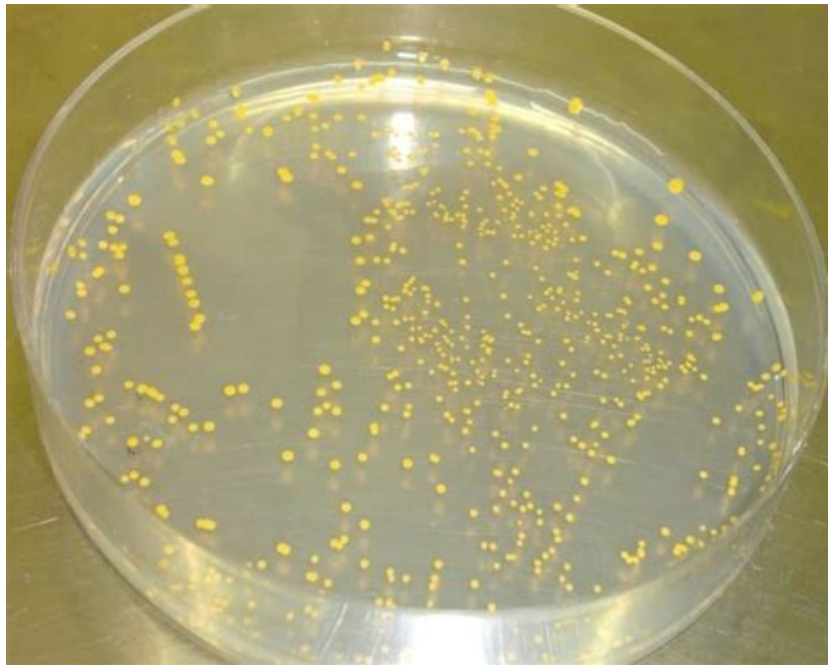


Рис. 8.1. Культуральні ознаки колоній *Corynebacterium glutamicum* на агаризованому середовищі (Leszczewicz, M., & Walczak, P., 2019).

8.1.2. Мікроскопіювання

Експрес-метод аналізу контамінації та морфології клітин.

Експрес-метод аналізу контамінації (нативна крапля)

Краплю поживного середовища (100 мкл) наносять на предметне скло та накривають покривним. Переглядають препарат при збільшенні 400× та 1000×. При виявленні будь-яких рухливих форм, відмінних від продуцента (*C. glutamicum* є нерухомим), або морфологічно відмінних клітин (наприклад, коків, великих паличок, дріжджів), середовище вважається контамінованим.

Контроль морфології клітин (фарбування за Грамом)

Зі стерильно відібраної проби готують мазок на предметному склі, фіксують та фарбують за методом Грама. У мікроскопі при збільшенні 1000× (з імерсією) повинні спостерігатися типові для *C. glutamicum* клітини: грам-позитивні (фіолетові), прямі або злегка вигнуті палички розміром 0,5–0,9 × 1,5–5 мкм. Характерною ознакою є "булавоподібні" потовщення на кінцях та специфічне розташування клітин у вигляді латинських літер V, L, Y ("китайські ієрогліфи") або "палісаду", що зумовлено типом поділу клітин. Також можуть спостерігатися метакроматичні гранули волютину на полюсах клітин (RCPATH, 2025).



Рис. 8.2. Мікроскопія клітин *Corynebacterium glutamicum*, збільшення $\times 1000$
(D'Onofrio, A. 2004)

8.2. Технологічний контроль

8.2.1. Визначення концентрації біомаси

Оскільки біомаса не є кінцевим продуктом виробництва, а її визначення слугує для контролю динаміки розвитку культури, доцільним є використання швидкого експрес-методу - спектрофотометрії (вимірювання оптичної густини).

Принцип методу: Метод базується на здатності клітинної суспензії розсіювати світло. Оптична густина (OD) суспензії при певній довжині хвилі пропорційна концентрації клітин (в межах лінійності закону Бугера-Ламберта-Бера). Для *Corynebacterium glutamicum* вимірювання зазвичай проводять при довжині хвилі 600 нм (OD_{600}).

Обладнання: Спектрофотометр, кювети з довжиною оптичного шляху 1 см.

Процедура:

4. Відбирають 5–10 мл культуральної рідини.

5. Якщо очікувана оптична густина перевищує 0,8–1,0 од., пробу розводять дистильованою водою або фізіологічним розчином (наприклад, у 10, 20 або 50 разів), щоб значення потрапило в лінійний діапазон приладу.

6. Вимірюють оптичну густина при 600 нм відносно чистого розчинника (води/середовища).

Розрахунок: Концентрацію сухої біомаси (X , г/л) розраховують за калібрувальним графіком або за формулою з використанням емпіричного коефіцієнта перерахунку (для *C. glutamicum* 1 од. $OD_{600} \approx 0,25 - 0,3$ г сухої ваги/л (Lu L., et al, 2020)):

$$X = OD_{600} \times n \times k$$

де: OD_{600} - виміряна оптична густина; n - коефіцієнт розведення; k - коефіцієнт перерахунку (визначається експериментально шляхом гравіметричного аналізу).

8.2.2. Визначення концентрації ацетоїну

Для кількісного визначення ацетоїну в культуральній рідині використовують колориметричний метод, заснований на модифікованій реакції Фогеса-Проскауера (Voges-Proskauer).

Принцип методу: Ацетоїн (ацетилметилкарбінол) у лужному середовищі в присутності кисню повітря окиснюється до діацетилу. Діацетил реагує з гуанідиновими групами (які містяться в креатині, що додається до реактиву), утворюючи забарвлений комплекс червоного кольору. Інтенсивність забарвлення, яку вимірюють при 530 нм, пропорційна концентрації ацетоїну (Li, Y., 2023).

Реактиви:

- **Реактив А:** 5% розчин α -нафтолу в 95% етанолі (або абсолютному спирті). Готують безпосередньо перед використанням.
- **Реактив В:** 40% розчин КОН, що містить 0,3% креатину (для підсилення та стабілізації забарвлення).

Процедура:

7. Пробу культуральної рідини центрифугують (10 000 g, 5 хв) для відділення клітин. Супернатант при необхідності розводять водою, щоб концентрація ацетоїну потрапила в діапазон калібрування (0–100 мг/л).
8. У пробірку вносять 3 мл підготовленого зразка (або стандарту).
9. Додають 0,3 мл Реактиву А і ретельно перемішують.
10. Додають 0,1 мл Реактиву В і знову перемішують.
11. Інкують суміш при 30 °С протягом 30 хв (або при кімнатній температурі 60 хв) для розвитку забарвлення. Важливо забезпечити доступ повітря (не закривати щільно), оскільки реакція потребує окиснення.
12. Вимірюють оптичну густину при 530 нм (A_{530}) проти холостої проби (вода + реактиви).

Розрахунок: Концентрацію ацетоїну (C , г/л) визначають за калібрувальним графіком, побудованим за стандартними розчинами чистого ацетоїну:

$$C = C_{\text{граф}} \times n$$

де: $C_{\text{граф}}$ - концентрація, знайдена за графіком (мг/л); n - коефіцієнт розведення проби.

8.2.3. Визначення концентрації джерела Карбону (глюкози) у середовищі

Для контролю залишкової концентрації глюкози та керування процесом підживлення використовують метод з 3,5-динітросаліциловою кислотою (DNS-метод). Це швидкий і надійний метод для визначення відновлюючих цукрів.

Принцип методу: У лужному середовищі при нагріванні відновлюючі цукри (глюкоза) відновлюють 3,5-динітросаліцилову кислоту (жовтого кольору) до 3-аміно-5-нітросаліцилової кислоти (оранжево-червоного кольору). Інтенсивність забарвлення при 540 нм пропорційна концентрації глюкози (Goyal A., Kumar H., 2022).

Реактиви:

- **Реактив DNS:** Розчиняють 10 г 3,5-динітросаліцилової кислоти, 2 г фенолу, 0,5 г сульфату натрію та 10 г гідроксиду натрію у воді, доводять

об'єм до 1 л. Додають 40% розчин сегнетової солі (калій-натрій виннокислий) для стабілізації кольору.

Процедура:

1. Відбирають пробу культуральної рідини, центрифугують для видалення біомаси. Супернатант розводять так, щоб концентрація глюкози була в межах 0,1–2,0 мг/мл.
2. У пробірку вносять 1 мл розведеного зразка та 1 мл реактиву DNS.
3. Суміш кип'ятять на водяній бані рівно 5 хвилин.
4. Швидко охолоджують до кімнатної температури.
5. Додають 10 мл дистильованої води, перемішують.
6. Вимірюють оптичну густину при 540 нм (A_{540}) проти холостої проби (вода + DNS, що пройшла таку ж обробку).

Розрахунок: Концентрацію глюкози визначають за калібрувальним графіком.

8.2.4. Визначення концентрації джерела Нітрогену (амінного азоту)

Оскільки в середовищі використовуються складні органічні джерела азоту (дріжджовий та кукурудзяний екстракти, сечовина), доцільно контролювати вміст вільних амінокислот та амонію за допомогою нінгідринової реакції.

Принцип методу: Нінгідрин реагує з вільними α -аміногрупами амінокислот, пептидів та аміаком при нагріванні, утворюючи забарвлений комплекс фіолетового кольору (пурпур Руеманна). Максимум поглинання комплексу знаходиться при 570 нм (Li, Y., 2023).

Реактиви:

- **Нінгідринний реактив:** 0,25% розчин нінгідрину в суміші етанолу та ацетатного буфера.

Процедура:

1. Центрифуговану пробу культуральної рідини розводять.
2. До 1 мл проби додають 1 мл нінгідринного реактиву.
3. Нагрівають на киплячій водяній бані протягом 15–20 хв.
4. Швидко охолоджують, додають 5 мл розчинника (етанол/вода) для стабілізації.

5. Вимірюють оптичну густину при 570 нм.

Розрахунок: Вміст амінного азоту розраховують за калібрувальним графіком, побудованим за стандартом (гліцином або лейцином).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. TrendEconomy. (2024, January 28). Ukraine | Imports of HS 2914 “Ketones and quinones, whether or not with other oxygen function ...” by partner country, 2023. TrendEconomy. [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://trendeconomy.com/data/h2/Ukraine/2914>
2. European Parliament, & Council of the European Union. (2008). Regulation (EC) No 1333/2008 on food additives. Official Journal of the European Union, L 354, 16–33. [Електронне джерело] – Режим доступу: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2008/1333/oj/eng>
3. Lu L., Mao Y., Kou M., Cui Z., Jin B., Chang Z., ... Chen T. (2020). Engineering central pathways for industrial-level (3R)-acetoin biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbial Cell Factories*, 19, 1–16. [Електронне джерело] – Режим доступу: <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01357-5>
4. U.S. Food and Drug Administration. (2025). GRAS Notice Inventory: Acetoin (GRN No. 1082).[Електронне джерело] – Режим доступу: <https://www.fda.gov>
5. Wikipedia contributors. (2024, 02 лютого). Acetoin. Wikipedia, The Free Encyclopedia.[Електронне джерело] – Режим доступу: <https://en.wikipedia.org/wiki/Acetoin>
6. Acetoin. (2025). Wikipedia.[Електронне джерело] – Режим доступу: <https://en.wikipedia.org/wiki/Acetoin>
7. Acetoin. (2025). Material Properties.[Електронне джерело] – Режим доступу: <https://material-properties.org/acetoin/>
8. Ацетоїн (Acetoin). (2025). Prom.ua.[Електронне джерело] – Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1867539664-atsetoin-513-acetoin.html>
9. Codex Alimentarius Commission. (1995). Стандарт для харчових добавок (CODEX STAN 192-1995).[Електронне джерело] – Режим доступу: https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/984_028-08#Text
10. U.S. Food and Drug Administration. (2025). Acetoin. [Електронне джерело] – Режим

доступу: <https://www.hfpappexternal.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=FoodSubstances&id=ACETOIN>

11. Li, Y., Zhao, X., Yao, M., Yang, W., Han, Y., Liu, L., Zhang, J., & Liu, J. (2023). Mechanism of microbial production of acetoin and 2,3-butanediol optical isomers and substrate specificity of butanediol dehydrogenase. *Microbial Cell Factories*, 22(1), 165. [Электронне джерело] – Режим доступу: <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02163-6>
12. Magee R. J., & Kosaric N. (1987). The microbial production of 2,3-butanediol. In *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 32, 89–161). Academic Press. [Электронне джерело] – Режим доступу: [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70079-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70079-0)
13. Romano P., & Suzzi G. (1996). Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2), 309–315. [Электронне джерело] – Режим доступу: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16535349/>
14. Ryan E. D., & Kohlhaw G. (1974). Subcellular localization of isoleucine-valine biosynthetic enzymes in yeast. *Journal of Bacteriology*, 120(2), 631–637. [Электронне джерело] – Режим доступу: <https://doi.org/10.1128/jb.120.2.631-637.1974>
15. Ehsani M., Fernández M. R., Biosca J. A., Julien A., & Dequin S. (2009). Engineering of 2,3-butanediol dehydrogenase to reduce acetoin formation by glycerol-overproducing, low-alcohol *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(10), 3196–3205. [Электронне джерело] – Режим доступу: <https://doi.org/10.1128/AEM.02157-08>
16. Bae S. J., Kim S., & Hahn J. S. (2016). Efficient production of acetoin in *Saccharomyces cerevisiae* by disruption of 2,3-butanediol dehydrogenase and expression of NADH oxidase. *Scientific Reports*, 6, 27667. [Электронне джерело] – Режим доступу: <https://www.nature.com/articles/srep27667>
17. Chai L. J., Qiu T., Lu Z. M., ... Xu Z. H. (2020). Modulating microbiota metabolism via bioaugmentation with *Lactobacillus casei* and *Acetobacter pasteurianus* to

- enhance acetoin accumulation during cereal vinegar fermentation. *Food Research International*, 138, 109737. [Электронне джерело] – Режим доступу: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109737>
18. Wang Q., Zhang X., Ren K., ... Rao Z. (2022). Acetoin production from lignocellulosic biomass hydrolysates with a modular metabolic engineering system in *Bacillus subtilis*. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 15(1), 87. [Электронне джерело] – Режим доступу: <https://doi.org/10.1186/s13068-022-02185-z>
19. Bae S. J., Kim S., Park H. J., ... Hahn J. S. (2021). High-yield production of (R)-acetoin in *Saccharomyces cerevisiae* by deleting genes for NAD(P)H-dependent ketone reductases. *Metabolic Engineering*, 66, 68–78. [Электронне джерело] – Режим доступу: <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2021.04.005>
20. Bernard K. A., Funke G., & Collins M. D. (2012). *Corynebacterium glutamicum*. In W. B. Whitman (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2nd ed., Vol. 5, 1310–1313). Springer. [Электронне джерело] – Режим доступу: https://www.researchgate.net/publication/258225790_Corynebacterium_Glutamicum
21. Dai, J., Zhang, D., Li, Z., & Xiu, Z. (2017). Salting-out extraction of acetoin from fermentation broth using ethyl acetate and K_2HPO_4 . *Separation and Purification Technology*, 184, 275–279. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.05.012>
22. Fu, C., Li, Z., Sun, Z., & Xie, S. (2021). A review of salting-out effect and sugaring-out effect: Driving forces for novel liquid-liquid extraction of biofuels and biochemicals. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 15(4), 854–871. <https://doi.org/10.1007/s11705-020-1980-3>
23. Lu, L., Mao, Y., Kou, M., Cui, Z., Jin, B., Chang, Z., Wang, Z., Ma, H., & Chen, T. (2020). Engineering central pathways for industrial-level (3R)-acetoin biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 102. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01363-8>
24. Taiwo, A. E., Madzimbamuto, T. N., & Ojumu, T. V. (2025). Recovery of acetoin from *Bacillus subtilis* fermentation broth by supercritical CO_2 extraction. *Biomass*

Conversion and Biorefinery, 15, 5351–5359. <https://doi.org/10.1007/s13399-024-05298-7>

25. Zhang, C., Yang, M., Wu, K., Wang, J., Zheng, Z., & Zeng, A.-P. (2022). Fermentation and downstream processing strategies for the optical purity of (R)- and (S)-acetoin. *Fermentation*, 8(7), 312. <https://doi.org/10.3390/fermentation8070312>
26. The Observatory of Economic Complexity (OEC). Ukraine: Ketone-alcohols nes, ketone-aldehydes (HS 291440) - trade profile (2023 data). The Observatory of Economic Complexity, 2025. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://oec.world/en/profile/bilateral-product/ketone-alcohols-nes-ketone-aldehydes/reporter/ukr>.
27. Львівський обласний центр контролю та профілактики хвороб МОЗ України. 3 11 липня в Україні заборонено продаж сигарет з ароматизаторами. Львівський обласний центр контролю та профілактики хвороб МОЗ України, 2024. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://lviv.cdc.gov.ua/post/%D0%B7-11-%D0%BB%D0%B8%D0%BF%D0%BD%D1%8F-%D0%B2-%D1%83%D0%BA%D1%80%D0%B0%D1%97%D0%BD%D1%96-%D0%B7%D0%B0%D0%B1%D0%BE%D1%80%D0%BE%D0%BD%D0%B5%D0%BD%D0%BE-%D0%BF%D1%80%D0%BE%D0%B4%D0%B0%D0%B6-%D1%81%D0%B8%D0%B3%D0%B0%D1%80%D0%B5%D1%82-%D0%B7-%D0%B0%D1%80%D0%BE%D0%BC%D0%B0%D1%82%D0%B8%D0%B7%D0%B0%D1%82%D0%BE%D1%80%D0%B0%D0%BC%D0%B8%D0%B7%D0%B0%D1%82%D0%BE%D1%80%D0%B0%D0%BC%D0%B8>.
28. Vigon International. (2025). Acetoin Natural (Acetyl Methyl Carbinol). [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.vigon.com/product/acetoin-natural-acetyl-methyl-carbinol/>

29. Made-in-China.com. (2025). Acetoin - product listings & indicative prices. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.made-in-china.com/products-search/hot-china-products/Acetoin.html>
30. ChemicalBook. (2025). Acetoin - Price. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.chemicalbook.com/Price/Acetoin-3.htm>
31. Sigma-Aldrich (Merck). (2025). Acetoin - product listings (natural, FG; analytical/for synthesis). [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.sigmaaldrich.com/US/en/search/acetoin?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=acetoin&type=product>
32. Державна служба статистики України. (2021). Номенклатура промислової продукції (НПП). NPP_2021.pdf [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://ukrstat.gov.ua/klasf/st_kls/NPP_2021.pdf
33. Головне управління статистики у Чернігівській області. Статистичні дані: промислова продукція за видами (код НПП 10.71.12.00.30), 2021 р. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://www.chernigivstat.gov.ua/statdani/promisl/P7_2021.htm (дата звернення: 02.01.2026).
34. Perflavory. Acetoin (Natural): safety, suppliers and safety-in-use (including food use categories and typical levels) [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.perflavory.com/docs/doc1007331.html>
35. The Good Scents Company. Acetoin (CAS 513-86-0): food category use levels (incl. baked goods max. 32 ppm; FEMA-based) [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.thegoodscentscompany.com/data/rw1009221.html>
36. Головне управління статистики у Харківській області. (2021). Виробництво основних видів промислової продукції (щорічно). [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://kh.ukrstat.gov.ua/index.php/vyrobnytstvo-osnovnykh-vydiv-promyslovoi-produktsii-schorichno>
37. Головне управління статистики у Херсонській області. (2021). Виробництво промислової продукції за видами за 2021 рік. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://ks.ukrstat.gov.ua/arkhiv-2021-roku/2615-virobnitstvo->

[promislovoji-produksiji-za-vidami-u-2021-rotsi/8949-virobnitstvo-promislovoji-produksiji-za-vidami-za-2021-rik.html](https://www.promislovoji-produksiji-za-vidami-u-2021-rotsi/8949-virobnitstvo-promislovoji-produksiji-za-vidami-za-2021-rik.html)

38. Sawal, J. (2025, November 18). Croissant market size, share & 2034 growth trends report. Emergen Research. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.emergenresearch.com/industry-report/croissant-market>
39. flavor.gr. (2025). Butter Cream 442002 K Evarom. Flavor. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.flavor.gr/flavoren/index.php/butter-cream-442002-k>
40. Comquima. Used SOFAST stainless steel 316L 511 liters aseptic reactor with jacket, agitation and heat insulation [Product page]. Comquima. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.comquima.com/en/used-sofast-stainless-steel-316l-511-liters-aseptic-reactor-with-jacket-agitation-and-heat-insulation>
41. LABOAO. 50L double layer jacketed stainless steel reactor (Model LSR-50L) [Product page]. Zhengzhou Laboao Instrument Equipment Co., Ltd. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.laboao.com/products/stainless-steel-reactor/50l-double-layer-jacketed-stainless-steel-reactor>
42. Zhengzhou Laboao Instrument Equipment Co., Ltd. Laboao 5L lab-scale stainless steel jacketed reactor for precision temperature control (Model LSR-5L) [Product page]. Made-in-China. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://laboao.en.made-in-china.com/product/HdXfZAbPXuGg/China-Laboao-5L-Lab-Scale-Stainless-Steel-Jacketed-Reactor-for-Precision-Temperature-Control.html>
43. Comquima Europe. Reactor BECOMIX Minilab stainless steel 5 litres [Product page]. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://comquima.com/en/reactors/reactor-becomix-minilab-stainless-steel-5-litres>
44. Surplus Record. 2007 LEE 110LDP, 30 gallon (110 liter) jacketed vacuum reactor, stainless steel [Product listing]. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://surplusrecord.com/ko/listing/30-gallon-lee-sanitary-jacketed-reactor-vacuum-vessel-stainless-steel-24-diameter-x-16-t-t-60-psig-308-f-shell-90-psig-332-f-jacket-413968/>

45. Tecnic Process Equipment Manufacturing S.L.U. (2020). Technic reactor stainless steel 316L 125 liters with jacket and agitation [Product page]. Comquima Europe. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://comquima.com/en/reactors/technic-reactor-stainless-steel-316l-125-liters-with-jacket-and-agitation>
46. Aurora Pro Scientific LLC. Industrial peristaltic metering pump N6-30L, high flow rate 30 liters/min, motor speed 0.1–300 RPM [Product page]. Aurora Pro Scientific. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.auroraprosci.com/Industrial-Peristaltic-Metering-Pump-High-Flow-Rate-30L-per-min-N6-30L>
47. DEBEM srl. Microboxer air-operated double diaphragm pumps [Catalogue & product pages]. Debem / Debem Ukraine. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.debem.com/en/products/air-operated-double-diaphragm-pumps/boxer/microboxer/>
48. Watson-Marlow Fluid Technology Solutions. 500 series cased pump (530 range) [Product page]. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.wmfts.com/en/watson-marlow-pumps/cased-pumps/500-series-cased-pump/>
49. Li, Y., Zhao, X., Yao, M., Yang, W., Han, Y., Liu, L., Zhang, J., & Liu, J. (2023). Mechanism of microbial production of acetoin and 2,3-butanediol optical isomers and substrate specificity of butanediol dehydrogenase. *Microbial Cell Factories*, 22(1), 165. [Электронное джерело] – Режим доступа: <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02163-6>
50. Goyal A., Kumar H. *Advanced techniques of analytical chemistry. Volume 1.* Bentham Science Publishers Pte. Ltd., Singapore. -2022. – p.: 106-110. [Электронный ресурс] - Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.2174/97898150502331220101>
51. Messelink, J. J. B., et al. (2021). Single-cell growth inference of *Corynebacterium glutamicum* reveals asymptotically linear growth. *eLife*, 10, e70106. <https://doi.org/10.7554/eLife.70106>

52. Royal College of Pathologists (RCPATH). (2025). ID 2 – Identification of *Corynebacterium* species (UK SMI). <https://www.rcpath.org/asset/C2255206-EECA-411B-8ED6BF003BEA57E3/>
53. Sumi, S., et al. (2019). Light-inducible carotenoid production in *Corynebacterium glutamicum*. *Scientific Reports*, 9, 11779. [Електронне джерело] – Режим доступу: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49384-7>
54. D’Onofrio, A. (2004, November 8). *Corynebacterium glutamicum* [Photograph]. Wikipedia. [Електронне джерело] – Режим доступу: [https://en.wikipedia.org/wiki/File:Corynebacterium_glutamicum_\(6269417254\).jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/File:Corynebacterium_glutamicum_(6269417254).jpg).
55. Leszczewicz, M., & Walczak, P. (2019). Selection of thermotolerant *Corynebacterium glutamicum* strains for organic acid biosynthesis. *Food Technology and Biotechnology*, 57(2), 249–259. <https://doi.org/10.17113/ftb.57.02.19.5980>
56. Пирог Т.П., Антонюк М.М. Загальна мікробіологія і вірусологія: Лаб. практикум. – К.: НУХТ, 2016. – 112 с.