

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ
Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»

«До захисту допущено»

Директор інституту (декан факультету) Завідувач кафедри

(підпис)

Грегірчак Н.М.
(прізвище та ініціали)

(підпис)

Пирог Т.П.
(прізвище та ініціали)

«__» _____ 2021 р.

«__» _____ 2021 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

із спеціальності 162 «Біотехнологія та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Промислова біотехнологія»

на тему Метаболіти мікробного походження як біобезпечні ароматизатори
для харчової промисловості

Виконав: здобувач 2 курсу, групи 1

Івасенко Максим Олександрович

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник Воронцов Олександр Олександрович

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

Рецензент

(прізвище та ініціали)

(підпис)

Засвідчую, що в цій
кваліфікаційній роботі
немає запозичень із праць
інших авторів без відповідних
посилань.

Здобувач _____

Київ – 2021 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Промислова біотехнологія»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Пирог Т.П.

“ 28 ” жовтня 2020 року

**З А В Д А Н Н Я
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА**

Івасенко Максима Олександровича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Метаболіти мікробного походження як біобезпечні
ароматизатори для харчової промисловості

керівник роботи Воронцов Олександр Олександрович, ктн., доцент,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від “26” жовтня 2020 року №868-
кв

2.Строк подання здобувачем роботи _____

3. Вихідні дані до роботи Ферментер об'ємом 60 м³

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Вступ; Літературний огляд; Розділ 1 Біотехнологічні методи отримання ароматичних сполук; 1.2 Генно-інженерні штами як продуценти ароматичних сполук; Розділ 2.Техніко-економічне обґрунтування; Розділ 3. Обґрунтування вибору технологічної схеми; Розділ 4. Матеріальний баланс ділянки фермента- ції; Розділ 5.Специфікація обладнання; Розділ 6. Опис технологічної схеми; Розділ 7. Контроль виробництва та виділення та очищення ароматизатору лімонену Escherichia coli BL21

5. Перелік графічного матеріалу

Апаратурна схема (2 аркуші), технологічна схема

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 28 жовтня 2020 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Вступ	29.10.2020-03.11.2020	
2	Літературний огляд	03.11.2020-23.11.2020	
3	Розділ 1 Біотехнологічні методи отримання ароматичних сполук	23.11.2020-26.11.2020	
4	1.2 Генно-інженерні штами як продуценти ароматичних сполук	26.11.2020-30.11.2020	
5	Розділ 2. Техніко-економічне обґрунтування	01.12.2020-11.12.2020	
6	Розділ 3. Обґрунтування вибору технологічної схеми	15.12.2020-25.12.2020	
7	Розділ 4. Матеріальний баланс ділянки ферментації	15.12.2020-04.01.2021	
8	Розділ 5. Специфікація обладнання	04.01.2021-14.01.2021	
9	Розділ 6. Опис технологічної схеми	14.01.2021-20.01.2021	
10	Розділ 7. Контроль виробництва та виділення та очищення ароматизатора лимонену <i>Escherichia coli</i> BL21	20.01.2021-24.01.2021	
11	Оформлення апаратурної схеми	24.01.2021-28.01.2021	

Здобувач _____
(підпис)

Івасенко М.О. _____
(прізвище та ініціали)

Керівник роботи _____
(підпис)

Воронцов О.О. _____
(прізвище та ініціали)

Реферат

Представлена кваліфікаційна робота на здобуття отсвітнього ступеня магістра присвячена розробці технології та апаратурної схеми біосинтезу ароматизатора лімонену штамом *Escherichia coli* BL21 на середовищі, яке містить гліцерин і середовище M9 як джерело вуглецю і виділення цільового продукту лімонену. Штам *E. coli* BL21 здатен синтезувати 2,7 г/л лімонену, розрахована потужність виробництва становить 31 815,38 літрів або 9,6 кілограм за цикл.

Розрахована потужність виробництва становить 1 330 кг за 300 трудоднів. Технологічний процес біосинтезу включає допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, підготовка та стерилізація поживних середовищ) та основні роботи (підготовка посівного матеріалу в колбах на качалці та в інокуляторах об'ємом 60,600 і 6 м³ та виробничий біосинтез в ферментері об'ємом 60 м³).

Кваліфікаційна робота складається з вступу, шести розділів, списку використаної літератури (найменувань), технологічної (формат A1) та 2 апаратурних схем (A1 і A1). Загальний обсяг роботи – 154 сторінки, 25 таблиць, 13 рисунки.

Ключові слова: ароматизатор лімонен, біосинтез, *Escherichia coli* BL21, середовище M9, гліцерин.

Зміст

Реферат.....	4
Вступ	6
Літературний огляд	8
Розділ 1. Біотехнологічні методи отримання ароматичних сполук.....	8
1.2. Генно-інженерні штами як продуценти ароматичних сполук.	12
1.2.1. Отримання ваніліну.....	12
1.2.2. Отримання 2,3-бутандіолу.....	19
1.2.3. Отримання фенілетанолу.	32
1.2.4. Отримання γ -декалактону.....	37
1.2.5. Отримання лімонену.	41
Розділ 2. Техніко-економічне обґрунтування.....	49
Розділ 3. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....	55
Розділ 4. Матеріальний баланс ділянки ферментації.....	92
Розділ 5. Специфікація обладнання	110
Розділ 6. Опис технологічної схеми	116
Розділ 7. Контроль виробництва та виділення та очищення ароматизатору лімонену <i>Escherichia coli</i> BL21.....	131
Висновок	145
Список використаної літератури:	146

Вступ

На сьогодні ринок ароматизаторів стрімко зростає. Так у 2018 році ринок ароматичних сполук склав 27 мільярдів доларів (зростання за останні 3 роки майже на 35 %), причому відстежується тенденція відмови від синтетичних ароматизаторів і перехід до натуральних. Але на сьогодні «класичні» методи виробництва терпенів не можуть задовольнити потребу ринку.

До «класичних» методів відносять як отримання ароматичних сполук з рослинної сировини, так і хімічний синтез. Об'єми ароматичних сполук отриманих з рослинної сировини не може задовольнити потреби ринку, а також є випадки, коли через спалах захворювань рослин або стихійні лиха на певних територіях втрачалась необхідна сировина. Отримання ароматизаторів за допомогою хімічного синтезу не задовольняє вимог ринку, оскільки світова тенденція спрямована на збільшення споживання екологічно чистою продукції.

Тож є об'єктивна необхідність в розробці альтернативних методів отримання ароматичних сполук.

Ароматизатори рідкої форми є переважним видом продукту і їх доля становить 56,9 % ринку. Сухі ароматизатори частіше застосовують як смакові добавки при виробництві напівфабрикатів і напоїв.

Лімонен один з найважливіших та найпоширеніших терпенів у галузі смаку та аромату. Найчастіше лімонен використовують при виробництві харчових продуктів, миючих засобів, у косметичній та парфумерній промисловостях. На сьогодні є повідомлення про негативний вплив бактеріальної хвороби цитрусових на врожай відповідних культур.

					<i>НУХТ БТЕК 02. 02. 01 КП ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	Вступ	<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробник</i>		<i>Івасенко М.О</i>						
<i>Керівник</i>		<i>Воронцов О.О.</i>						
<i>Н. контр</i>								
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. Каф.</i>		<i>Пирог Т. П.</i>			<i>Кафедра БТМ</i>			

Оскільки цитрусові є основним природним джерелом лімонену, суттєве скорочення їх кількості спричинило ріст ціни на ароматизатор і дефіцит на відповідних ринках.

Альтернативою є отримання терпенів біотехнологічними методами. Отже на даний час є актуальним вивчення можливості та вдосконалення технологій отримання ароматичних сполук за допомогою мікроорганізмів.

В даній роботі розглядається можливість отримання лімонену культивуванням генно-модифікованого штаму *Escherichia coli* BL21, який володіє високим виходом цільового продукту – 2,7 г/л.

Актуальність: у зв'язку з широким використанням терпенів в харчовій промисловості та забезпечення потреб ринку України за рахунок імпорту, впровадження виробництва лімонену є актуальним.

Новизна: використання у якості продуцента генно-модифікованого штаму *Escherichia coli* BL21, який характеризується високим продуктивністю (2,7 г/л лімонену).

Літературний огляд

Розділ 1. Біотехнологічні методи отримання ароматичних сполук.

1.1. Класичні способи отримання ароматичних сполук (з рослин і хімічним синтезом).

На сьогодні відомі 3 основні способи отримання ароматичних сполук: екстракція з рослинної сировини, хімічний синтез та біотехнологічне виробництво.

Обробка рослинної сировини є найстарішим і найбільш вивченим методом отримання ароматичних сполук [8]. У даний час вихідний матеріал для виробництва ароматизаторів отримують більше ніж з 250 видів рослин. Як правило, екстракція з рослинної сировини має деякі загальні недоліки, які роблять їх занадто дорогими для промислового виробництва: низька концентрація цільового продукту, можливість виникнення екологічних проблем, що призводило до дефіциту сировини, неможливість повної автоматизації виробництва. Тому даний метод застосовують для отримання сполуки, яку неможливо отримати іншим способом. Так, наприклад, натуральні цитрусові олії отримують як побічний продукт виробництва соків за допомогою високоефективного автоматизованого обладнання, що мінімізує витрати. Були здійснені спроби виробити ароматизатори в рослинних клітинах або тканинах, щоб забезпечити стабільне постачання та якість продукту. Очікувалося, що культури *in vitro* збільшать необхідну кількість біомаси та зроблять її доступною в контрольованих умовах. Однак клітини, культивовані *in vitro*, виявляли знижену або навіть відсутність здатності виробляти леткі речовини порівняно з неушкодженою рослиною [7].

					<i>НУХТ БТЕК 02. 02. 01 КП ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробник</i>		<i>Івасенко М.О.</i>			<i>Літературний огляд</i>			
<i>Керівник</i>		<i>Воронцов О.О.</i>						
<i>Н. контр</i>								
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. Каф.</i>		<i>Пирог Т. П.</i>						
						<i>Кафедра БТМ</i>		

Так, при отриманні ароматичних сполук з рослинної сировини необхідно оцінити деякі фактори, такі як температура, світло, концентрація екстрагенту, технологію виділення цільової продукції та інш. Метод виділення ароматичної сполуки з певної рослини унікальний для кожної рослини. Усі фактори (температура, розчинники, швидкість перемішування тощо) можуть посилювати вилучення, але без належної технології очистки і виділення можуть спричинити деградацію цільової сполуки. Серед таких параметрів, як типи розчинника, стійкість розчинника, час вилучення, швидкість перемішування, співвідношення зразка-розчинник та температура, досліджені за допомогою експериментального дослідження міцність розчинника, що становить 70% етанолу, є найбільш впливовим фактором видобутку ароматичної речовини з *Curcuma longa* [39]. Аналогічна закономірність була виявлена при використанні 70% етанолу як найбільш придатного екстрагенту згідно параметрів при вилученні тритерпеноїдів з листя *Jatropha curcas* [2] та фенольних екстрактах з *Moringa oleifera* [3]. Серед цих досліджень оптимізації, найбільш впливовим параметром майже у всіх методах є типи розчинників та міцність[1].

Хімічні методи можуть задовольнити потребу ринку в ароматичних сполуках, однак ароматизатори, отримані цим методом, не можна класифікувати як натуральні. В Європейському і Американському законодавстві натуральним ароматизатором може називатися тільки ароматичні речовини, які були отримані з рослин, або отримані за допомогою біотехнології[9].

Ще одним недоліком отримання ароматичних сполук за допомогою хімічного синтезу є велика кількість відходів, яка утворюється під час синтезу цільової сполуки, наприклад стічні води, каталізатори хімічних реакцій. Також до недоліків хімічного виробництва можна віднести агресивність реакцій, які проходять у хімічному реакторі, що в свою чергу

призводить до необхідності особливої герметизації обладнання, через це до самого обладнання висуваються суворі вимоги. Багато хімічних реакцій відбувається з нераціональним використанням об'ємів апаратів. Це спричинено необхідністю великих об'ємів компонентів, які мають прореагувати, і їх нерівному співвідношенню, а також забезпеченням кращого коефіцієнта теплопередачі[47,48].

Як приклад можна привести синтез тригідроксипохідних лімонену. Так, окислення діолу під впливом діоксиду селену (SeO_2) яке може безпосередньо призвести до утворення триолу, протікає неселективно. За результатами газової хроматографії, в результаті цієї реакції утворюється суміш чотирьох основних продуктів в приблизно рівній кількості, а також ряд мінорних продуктів.

Більш ефективним виявилось алільне бромовання діола. Так, взаємодія даного з'єднання в присутності 2-бутоксietанолу (BuO_2) при кип'ятінні протягом 3 годин з подальшим нанесенням реакційної суміші без обробки водою на колонку з діоксидом кремнію (SiO_2) і хроматографуванням був отриманий бромід. Для порівняння: при стандартній обробці реакційної суміші, що включає промивання розчином сульфітом натрію (Na_2SO_3), осушення органічної фази, концентрування і поділ колоночною хроматографією, вихід броміду становив тільки 10%. Слід зазначити що використання діацетату в реакції алільного бромовання замість діолу призвело до зменшення селективності процесу, в результаті якого утворилася складна суміш продуктів. Взаємодія броміду з ацетатом натрію (NaOAc) хвилиною диметилсульфоксиду і подальше омилення ацетату дозволило отримати п-мента-1,8-діен-5,6,10-тріол (тригідроксипохідних лімонен) з сумарним виходом 55%[10].

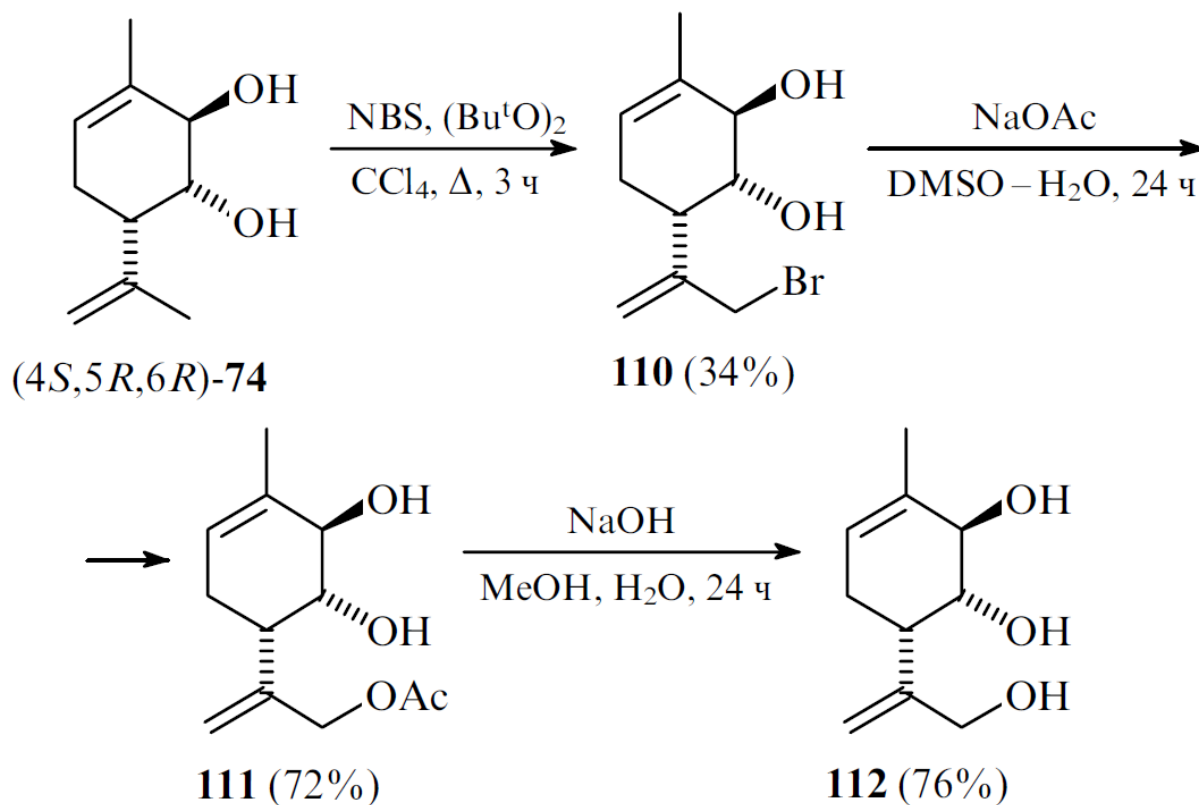


Рис.1.1. Алільне бромовання діолу з Ацетатом натрію і утворення похідного лімонену

Таким чином: отримання ароматичних сполук методами екстракції з рослинної сировини та хімічним синтезом не задовольняє потреб світової економіки, а хімічний синтез не відповідає сучасним вимогам до якості продукту.

1.2. Генно-інженерні штами як продуценти ароматичних сполук.

1.2.1. Отримання ваніліну

Найбільш важливим ароматизатором класу фенольних альдегідів є ванілін [44]. Ванілін природного походження отримують екстракцією з ванільних орхідей *Vanilla planifolia* і *Vanilla tahitensis* [25]. Щорічне світове споживання ваніліну перевищує 16 000 тонн, однак через повільне зростання орхідей і низькі концентрації ваніліну в цих рослинах (близько 2% від сухої маси) тільки близько 0,25% споживаного ваніліну добувають з ванільних орхідей. Останнім часом отримання ваніліну з рослинної сировини значно погіршилося через циклон який вдарив по основному постачальнику цих рослин, що обумовило підняття ціни на дану сполуку[1]. Велика частина попиту на ринку задовольняється хімічним синтезом ваніліну з лігніну або виходних вуглеводнів. Однак, дані процеси негативно впливають на екологічний стан довкілля. Мікробні біотехнології є альтернативним шляхом виробництва ваніліну. Біотехнологічний продукт класифікується як натуральний ванілін згідно з європейським і американським харчовим законодавством[19,20,46]. Дослідження виробництва ваніліну біотехнологічним шляхом проводиться в таких напрямках: отримання генно-модифікованих штамів-продуцентів ваніліну, використання біоконверсії, іммобілізованих ферментів.

Ні Джун з групою дослідників (Копенгагенський університет) проводили дослідження з розробки нового метаболічного підходу для синтезу ваніліну. Дослідження було спрямовано на підвищення синтезу ваніліну культивуючи бактерії *Escherichia coli*. Штучна система метаболізму, яка була описана для культивування *E. coli* VT-4 складається з п'яти ферментів, включаючи тирозинову аміачну ліазу (ЕС 4.3.1.23), 4-кумарат 3-гідроксилазу (ЕС 1.14.14.9), кофеат О-метилтрансферазу (ЕС 2.1.1.68), транс-ферулоїл-КоА синтетазу (ЕС 6.2.1.34) та еноїл-КоА

гідратазу / альдолазу (ЕС 4.2.1.17). Таким чином, в результаті ряду реакцій l-тирозин може бути перетворений у ванілін. Ванілін-синтаза з *Vanilla planifolia* може безпосередньо перетворити ферулову кислоту у ванілін. Гени *fcs* та *ech* (кодуючі FCS та ECH відповідно), виділені від *Streptomyces sp.*, були вбудовані в геном *E. coli*. Для перетворення ферулової кислоти у ванілін була сконструйована плазміда *fcs-ech/pE*. Наступним кроком було введення штучного біосинтетичного шляху в тирозино-надвиробничий штам *E. coli*, що містить плазмиду *tyrAfbr-aroGfbr-tktA-ppsA/pCOLA*, і нокаутуючу мутацію в *tyrR*. Інактивація регульованої *tyrR* регуляції покращує фенотип продуцентів ароматичних амінокислот, що призводить до надсинтезу l-тироzinу. Плазміда кодує фосфоенолпіруват-синтетазу (PEPS: *ppsA*), транскетолазу (ТКТ: *tktA*), стійку до зворотного зв'язку (*fbr*) 3-дезоксид-арабіно-гептулозонат-7-фосфат-синтазу (*fbr-DANPS:aroGfbr*) та *fbr*-хоризматемутазу / префенатдегідрогеназу (*fbr-CM / PDH: tyrAfbr*). Надекспресія фосфоенолпіруват-синтетази (PEPS) і транскетолази (ТКТ) збільшує потік вуглецю в шлях біосинтезу ароматичної амінокислоти, а *fbr-DANPS* і *fbr-CM / PDH* можуть пригнічувати гальмування метаболітами.

Перенесення цього штучного шляху на катаболізм тирозину штамом *E. coli* VT-4 дозволило отримати ванілін з простих джерел вуглецю. Виробництво ваніліну з генно-модифікованої *E. coli* VT-4, яка містить гени *sam8-sam5-конт / pACYC* та *fcs-ech / pET*, досліджувалось з використанням середовища LB, яке в своєму складі містить 1 г/л ферулової кислоти та 0,2 ммоль ізопропіл- β -D-1-тіогалактопіранозиду як індуктор генів, як джерело вуглецю використовується l-тирозин, глюкоза, ксилоза та гліцерин.

Штучний біосинтетичний шлях отримання ваніліну з l-тироzinу був сконструйований у штамі *E. coli* VT-4, що продукує тирозин, шляхом трансформації клітин з двома плазмідами (*sam8-sam5-comt / pACYC* and *fcs-ech / pET*), які продукують такі ферменти як тирозин-аміак-ліаза (ЕС 4.3.1.23), 4-кумарат-3-гідроксилази (ЕС 1.14.14.9), кофеїн-О-метил-

трансферази (ЕС 2.1.1.68), трансферулоїл-СоА-синтази (ЕС 6.2.1.34), еноїл-КоА гідратаза/ альдолаза (ЕС 4.2.1.17). Ванілін отримували з 10 г/л глюкози, концентрація ваніліну склала 19,3 мг/л. Без глюкози вихід ваніліну був нижче межі виявлення. Щоб зменшити витрати, були проведені додаткові експерименти з середовищем М9 і глюкозою. Продукція ваніліну рекомбінантного штаму *E. coli* у ферментаційному середовищі та мінімальному середовищі М9, становив 15,7 мг/л. Порівняно із середовищем LB та ферментаційним середовищем, концентрація ваніліну була значно нижчою у мінімальному середовищі М9. Хоча вироблення ваніліну в ферментаційному середовищі було дещо нижчим, ніж вироблення в середовищі LB, концентрація (концентрація ваніліну, розділена на щільність клітин) був приблизно в 1,5 рази вищим у ферментаційному середовищі (досягаючи 19,3 мг/л) ніж у середовищі LB. При отриманні ваніліну з тирозину *E.coli* VT-4 вирощували на середовищі LB з додаванням 2 г/л тирозину і 0,2 мМ ізопропіл- β -D-1-тіогалактопіранозиду. Концентрація ваніліну склала 97,2 мг/л після 48 годин культивування при температурі 26 °С.

Для подальшої оптимізації умов росту культури рекомбінантного штаму *E. coli* VT-4, гліцерин був обраний як субстрат. Виробництво ваніліну (24,7 мг / л) спостерігалось, коли в середовище додавали 0,1 мМ ізопропіл- β -D-1-тіогалактопіранозиду. Більш високі концентрації ізопропіл- β -D-1-тіогалактопіранозиду (IPTG) знижували титр ваніліну, і лише 11,3 мг/л ваніліну було виявлено у середовищі, коли концентрація ізопропіл- β -D-1-тіогалактопіранозиду (IPTG) була 1 мМ. Виробництво ваніліну в середовищі з 15 г/л, 20 г/л або 25 г/л гліцерину становило відповідно 24,5 мг/л, 25,3 мг/л і 25,9 мг/л відповідно. Однак вироблення ваніліну знизилось до 14,3 мг/л, коли концентрація гліцерину в поживному середовищі становила 5 г/л. Ці результати показують, що 10 г/л гліцерину достатньо для виробництва ваніліну. Молярна конверсія тирозину у ванілін

становила 4,8%, що є відносно низьким результатом. Це було пов'язано з утворенням невеликої кількості вінілового спирту, а також великою кількістю побічних реакцій. Плазмиду *fcs-ech-sam5* / pET з додатковим геном *sam5* було сконструйовано для заміни плазмиди *fcs-ech* / pET. Хоча результати полімеразної зворотної транскрипційної ланцюгової реакції вказували на те, що рівень експресії гена *sam5* був поліпшений у VT-5 (рекомбінантна *E. coli*, що містить *sam8-sam5-comt* / pACYC та *fcs-ech-sam5* / pET) виробництво ваніліну з VT-5 було аналогічним виробництву VT-4. Крім того, невелика кількість 4-кумарової кислоти все ще залишається в культурі VT-4 (близько 21,4 мг/л), що свідчить про те, що ферментативна активність СЗН може бути критичним фактором для вироблення ваніліну в метаболічній системі. В результаті був досягнутий титру ваніліну на глюкозі – 19,3 мг/л, тирозину -97,2 мг/л і з гліцерину – 24,7 мг/л. [25].

В роботі дослідника Пен Чена (Університет Ланьчжоу) було описана біоконверсія ферулової кислоти у ванілін використовуючи *Bacillus subtilis* B7-S.

У даному дослідженні був представлений новий штам *Bacillus subtilis* B7-S, який здатний до біоконверсії ферулової кислоти у ванілін. Було показано, що різна кількість ферулової кислоти мала неоднаковий вплив на кінцеву концентрацію ваніліну. Також були проведені експерименти зі впливом умов середовища на продукції ваніліну.

Ферулова кислота та ванілін мають інгібуючу дію на ріст бактерій. Хоча *B. subtilis* B7-S може отримувати енергію з середовища для перетворення ферулової кислоти у ванілін, концентрація субстрату може впливати на ріст *B. subtilis*. Бактерії перетворювали ферулову кислоту у ванілін при концентрації ферулової кислоти 0,2–0,8 г/л. Однак, коли концентрація ферулової кислоти була вище 0,8 г/л, здатність біоконверсії знижувалась. При концентрації ферулової кислоти 1,3 г/л бактерії не могли

рости на середовищі з такою високою концентрацією ферулової кислоти. Для підвищення толерантності штамів до вмісту ферулової кислоти, була обрана її початкова концентрація 0,8–1,0 г/л. При низькій концентрації ферулової кислоти (0,2 г / л ферулової кислоти), швидкість конверсії була досить високою, однак із збільшенням концентрації ферулової кислоти швидкість конверсії бактеріями зменшувалася. Так при концентрації 1,2 г / л, швидкість конверсії була нижче 5%, а при концентрації 1,6 г/л швидкість біоконверсії була нижче 1%. Пікова концентрація ваніліну 0,198 г/л утворювалась при концентрації ферулової кислоти 0,8 г/л, що на 105,2% вище початкового значення.

Таким чином, штам *B.subtilis* В7-S, здатних утворювати ванілін під час біоконверсії ферулової кислоти. Кілька дрібномасштабних експериментів показали, що максимальний показник біоконверсії становить 63,30% після 3 годин. Ванілін був підтверджений спектральним аналізом за допомогою ультрафіолетового спектру, індуктивно зчепленою плазмовою атомно-емісійною спектроскопією (ICP-AES) та інфрачервоною Фур'є-спектроскопією (FT-IR) [12].

Висновок: На сьогодні розробка альтернативних шляхів отримання ваніліну активно триває, оскільки є певна проблема з отриманням ваніліну з рослинної сировини, в свою чергу хімічний синтез впливає на екологію. Так в дослідженні данського вченого Ні Джуна був описаний метод конструювання генно-модифікованого штаму *E.coli* VT-4, який володіє здатністю виробляти ванілін використовуючи вторинну сировину. В роботі китайського вченого Пен Чена описана розробка генно-модифікованого штаму *B. subtilis* В7-S був описаний шлях перетворення ферулової кислоти в ванілін. Було показано, що різні умови культивування і різна концентрація ферулової кислоти по різному впливають на концентрацію ваніліну.

Біосинтез ваніліну

Продуцент	Поживне середовище	Концентрація цільового продукту, мг/л	Сфера практичного використання	Література
<i>E. coli</i> VT-4	Середовище LB з ферулової кислотою і 0,2 мМ IPTG, з додаванням глюкози, тирозину, гліцерину	19,3 97,2 24,7	харчова, парфумерна, фармацевтична промисловість	[25]

<i>B. subtilis</i> B7-S	Ферулова кислота – 0,6 г/л, 20% середовище <i>Luria-Bertani</i>	198	харчова, парфумерна, фармацевтична промисловість	[12]
-------------------------	---	-----	--	------

1.2.2. Отримання 2,3-бутандіолу.

2,3-бутандіолу є багатофункціональною платформою хімічною речовиною, яка може бути використана для виробництва різних хімічних речовин. При зневодненні 2,3-бутандіолу утворюється 1,3-бутадиєн, попередник синтетичного каучуку і рідкої паливної добавки метилетилкетону. Крім того, 2,3-бутандіол може бути дегідрований в ацетоїн і діацетил, які є цінними ароматизаторами в харчовій промисловості. 2,3-бутандіол можна каталізувати в тетраметилове з'єднання присадки до бензину і естерифікувати до 2,3-бутандіонового діефіру, попередника лікарських засобів і косметики. 2,3-бутандіол також має ряд корисних властивостей, таких як зволожуючі і стимулюючі ріст рослин. Світовий ринок 2,3-бутандіолу, як очікується, досягне понад 74 тис.тонн до 2018 року, а похідні 2,3 – бутандіолу, такі як 1,3-бутадиєн і метилетилкетон (МЕК), мають попит на світовому ринку понад 32 млн тонни на рік, оцінюваний приблизно в 43 млрд доларів США в продажах[36]. Очікується, що світовий ринок 2,3-бутандіолу в 2020 році буде складати 75 мільйонів доларів США, а до кінця 2026 року досягне 91 мільйона доларів США, збільшуючись в середньому на 2,9% протягом 2021-2026 років[49].

В роботі Соу-Джу Кіма (Сеульський національний Університет) описаний метод генетичної модифікації *Saccharomyces cerevisiae* для підвищення виходу 2,3-бутандіолу. *S. cerevisiae* культивували на поживному середовищі, що містило отримані з відходів виробництва цукри: ксилозу, целобіозу і галактозу. Автори зазначають, що на сьогодні для виробництва 2-3-бутандіолу найчастіше використовують генно-модифіковані штами *Klebsiella sp.* та *E. aerogenes*, які відносять до умовно патогенних, що в свою чергу перешкоджає їх використанню при

проектуванні виробництва. В свою чергу *S. cerevisiae* широко використовуваний в виробництві, а також генетичні маніпуляції з *S. cerevisiae* добре вивчені, тому його було обрано для дослідження можливості виробництва 2,3-бутандіолу.

На першому етапі отримували генно модифікований штам *S. cerevisiae*, який мав змогу синтезувати 2,3-бутандіол. Для направлення метаболічного потоку через ацетальдегід був сконструйований шлях накопичення ацетальдегіду через експресію генів *pflA* і *pflB*, які кодують піруватдекарбоксилазу, і гену *mgpF*, який кодує ацетальдегід дегідрогеназу від *Escherichia coli* і видалення генів *adh1*, *ADH3* і *ADH5*, що кодують основні алкогольдегідрогенази в *S. cerevisiae*. Такий генно сконструйований штам показав 51-кратне підвищення синтезу 2,3-бутандіолу (307 мг/л) порівняно з початковим штамом *S. cerevisiae* CENPK2-1C. Інший підхід був застосований для поліпшення конденсації ацетил-СоА і ацетальдегіду в ацетоїн за рахунок надекспресії генів *acoA* і *acoB*, що кодують компоненти ацетоїндегідрогенази E1 з *Bacillus subtilis*. Інженерний штам, що експресує гени *pfl*, *pfl*, *ase* і *cab*, а також ендогенні гени *CDH1* синтезував більшу кількість 2,3-бутандіолу ніж штам *S. cerevisiae* CENPK2-1C - 341 мг/л.

Дослідження зосередилися на розробці шляху біосинтезу 2,3-бутандіолу через α -ацетолактат, який каталізується α -ацетолактатсинтазою, α -ацетолактатдекарбоксилазою і 2,3-бутандіол- дегідрогеназою. У той час як синтез α -ацетолактату *S. cerevisiae* Pdc, кодований геном *ILV2*, існує в мітохондріях, інші ферменти в шляху 2,3-бутандіолу присутні в цитозолі. Оскільки присутність всіх біосинтетичних ферментів 2,3-бутандіолу в цитозолі сприятлива для ефективної продукції 2,3-бутандіолу, цитозольний Piv2p без мітохондріальної цільової послідовності був надекспресований в

S. cerevisiae Pdc. Зазначлось, що окиснювання α -ацетолактату в ацетоїн через діацетил може знижувати швидкість утворення 2,3-бутандіолу у *S. cerevisiae*. Щоб обійти ці перешкоди, була здійснена експресія гетерологічної цитозольної α -ацетолактатсинтази і α -ацетолактатдекарбоксілази. Вона каталізує пряме перетворення α -ацетолактату в ацетоїн в *S. cerevisiae* супроводжувалася гіперекспресією 2,3-бутандіолдегідрогенази. При періодичному культивуванні *S. cerevisiae* Pdc з використанням глюкози як джерела вуглецю, вихід 0,02 г / г був досягнутий шляхом спільної експресії генів *B. subtilis* alsS, що кодують α -ацетолактатсинтазу і генів *E. aerogenes* budA і budc, які відповідають за кодування ацетолактатдекарбоксілази і ацето]ндуктази відповідно. Експресія генів *B. subtilis* alsS і alsD, що кодують α -ацетолактатдекарбоксілазу, і ендогенний ген BDH1, що кодує 2,3-бутандіолдегідрогеназу, привели до отримання 700 мг / л 2,3-бутандіолу при періодичному культивуванні.

На другому етапі дослідження було здійснено підвищення виходу 2,3-бутандіолу, оскільки вихід був на дуже низькому рівні. Це пов'язано з утворенням етанолу, гліцерину і пірувату як побічного продукту, а також щоб підтримувати окислювально-відновлювальний баланс у цитозолі. Вихід 2,3-бутандіолу підвищували за рахунок модуляції алкогольдегідрогенази і піруватдекарбоксілази. Гени, які кодують алкогольдегідрогенази (*adh1*, ADH3 и ADH5) були введені в хромосому *S. cerevisiae* Pdc. Отриманий штам продукував 2,29 г/л 2,3-бутандіолу, що було в 47 більше, і зниження виходу етанолу в 3,2 рази в порівнянні вихідним штамом *S. cerevisiae* CENPK2-1C. Було виявлено, що зростання *S. cerevisiae* Pdc пригнічувала висока концентрація глюкози. Дихання на глюкозному середовищі пригнічується в *S. cerevisiae* Pdc, цитозольний

НАДН накопичується в клітинах, що тим самим уповільнює ріст клітин і швидкість споживання глюкози. Для зменшення впливу глюкози на клітини *S.cerevisiae* було введено гену MTH1, що кодує транскрипційний регулятор. Отриманий штам *S.cerevisiae* Pdc (BD4) продукував 96 г/л 2,3-бутандіолу без накопичення етанолу або пірвату. У цьому випадку інтенсифікація біосинтезу 2,3-бутандіолу у штамі *S. cerevisiae* Pbc значно підвищувала швидкість росту і швидкість споживання глюкози — в 4,1 рази в порівнянні з такими у даного штаму дріжджів без надмірної експресії шляху біосинтезу 2,3-бутандіолу. Підвищення швидкості росту клітин і підвищення швидкості метаболізму вуглецю пояснювалося тим фактом, що надекспресована бутандіолдегідрогеназа (bdh1p) в шляху 2,3-бутандіолу сприяє повторному окисленню цитозольних НАДН шляхом перетворення ацетоїну в 2,3-бутандіол, використовуючи НАДН в якості кофактора.

Було доведено, що оптимальні умови постачання кисню підвищують вихід 2,3-бутандіолу. У дослідженні використовували системи двоступеневого культивування 2,3-бутандіолу. Висока аерація (500 об / хв при культивуванні в качалочних колбах) на першій стадії збільшувала концентрацію клітин, в той час як обмеження кисню (300 об/хв при культивуванні в качалочних колбах) на другій стадії збільшувало потік 2,3-бутандіолу з накопиченого ацетоїну, що приводило до зниження утворення гліцерину на 74 %. Експресія НАДН-оксидази призводила до збільшення внутрішньоклітинної концентрації НАДН, що призводило до зсуву метаболізму вуглеводів з гліцерину на 2,3-бутандіол в клітинах *S. cerevisiae*. Ген Nox вилучений з *Lactococcus lactis*, який кодує водоутворюючу НАДН-оксидазу, експресувався в продукуючому штамі *S.cerevisiae* Pdc 2,3-бутандіолу, і культура цього штаму показала на 23,8 % більш високий вихід 2,3-бутандіолу і на 65,3 % більш низький вміст гліцерину в порівнянні з

контролем без експресії гена *Nox* [43]. Крім того, метаболічний флюкс був перенаправлений з етанолу і гліцерину на 2,3-бутандіол через блокування шляхів етанолу і гліцерину і експресію біосинтетичного шляху 2,3-бутандіолу і НАДН-оксидази *L. lactis*. Отриманий штамп *S.cerevisiae* Pdc виробляв 73 г/л 2,3-бутандіолу і продуктивністю 1,43 г/л/год. Найбільша концентрація і продуктивність 2, 3-бутандіолу *S. cerevisiae* були досягнуті при експресії гена *NOx* із *L. lactis* і гена *PDC1* із *C. tropicalis* в 2,3-бутандіол-продукуючому штамі *S. cerevisiae* [42]. Сконструйований штамп *S. cerevisiae* BD5_G1CtPDC1_pox синтезував 154,3 г/л 2,3-бутандіолу з продуктивністю 1,98 г/л/год і виходом 0,40 г/г в період періодичного бродіння при оптимізованій двоступеневій системі аерації.

Були проведені дослідження з можливості отримання 2,3-бутандіолу використовуючи лігноцелюлозну і водоростеву біомасу. Штамп *S. cerevisiae* не здатен метаболізувати ксилозу, який є основним моносахаридом в лігноцелюлозній біомасі. Для культивування штаму *S.cerevisiae* на лігноцелюлозній біомасі, гетерологічний ксилозо-асиміляційний шлях, який включає в себе ксилоредуктазу, ксилітдегідрогеназу які були вилучені із *Scheffersomyces stipites* і ендогенної ксилулозозкінази був надекспресований в клітинах *S.cerevisiae* Pdc. Таким чином утворений штамп утворював 44 г/л 2,3-бутандіолу з ксилози. Але оскільки лігноцелюлозна біомаса складається з різних моносахаридів, у тому числі глюкози та ксилози, під час ферментації спостерігається послідовне використання змішаних цукрів, яке викликає глюкозо-опосередковане інгібування транспорту ксилози. Це призводить до низької продуктивності ферментації. В якості альтернативи розглядалась целобіоза. Оскільки штамп *S. cerevisiae* Pdc не має генів, що кодують переносник целобіози і β -глюкозидазу, здатну розщеплювати целобіозу в глюкозу, вони не можуть метаболізувати

целобіозу як джерело вуглецю. Щоб одержати 2,3-бутандіол з целобіози в штамі *S. cerevisiae* Pdc-поряд з експресією генів біосинтезу 2,3-бутандіолу були введені гени, що кодують переносник целлодекстрину і внутрішньоклітинну β -глюкозидазу з целюлолітичного гриба *Neurospora crassa*. Отриманий штам виробляв 5,29 г/л 2,3-бутандіолу з целобіози з продуктивністю 0,22 г/л/год, що передбачало можливість стійкого і ефективного отримання 2,3-бутандіолу з целюлозних гідролікатів.

Як ще одна поновлювана сировина, морські макроводорості привернули велику увагу через значну перевагу перед цукровою та целюлозною біомасою. Відомо, що червоні водорості, такі як *Gelidium amansii*, поширені в природі, а їх гідролікат складається з глюкози і галактози [41]. При одночасному споживанні глюкози і галактози штам *S. cerevisiae* Pdc, в якому були надекспресовані гени для біосинтезу Mth1p і 2,3-бутандіолу (JL0432), продукував приблизно 100 г/л 2,3-бутандіолу [40]. Оптимізуючи співвідношення глюкози до галактози, штам *S. cerevisiae* bd2_mth1 продукував 100 г/л 2,3-бутандіолу з 0,353 г/г в живильному циклі культивування з початковим введенням 60 г/л глюкози і 60 г/л галактози і періодичним введенням суміші глюкози і галактози в співвідношенні 2:1 [36,4].

В роботі Ве Лінгу (Пекінський університет хімічних технологій) описані перспективи виробництва 2,3-бутандіолу, використовуючи водорості *Neptunomonas concharum*. Був розроблений і описаний шлях біосинтезу ацетоїну і мезо-2,3-бутандіолу *N. concharum*, титри ацетоїну і мезо-2,3-бутандіолу склали 0,56 г/л і 0,38 г/л відповідно. Незважаючи на низьку продуктивність, *N. concharum* є альтернативою традиційним мікроорганізмам, особливо враховуючи його здатність використовувати ацетат, який є вторинною сировиною.

Зазначалось, що *N. concharum* не здатен природним чином накопичувати ацетоїн або 2,3-буандіол, були проведені дослідження для того, щоб здійснити біосинтез ацетоїну і мезо-2,3-буандіолу в *N. concharum* і продемонструвати потенціал мікроорганізму для метаболічної інженерії. Плазмиду pMCS3AC, що містить ген alsSD з *B. subtilis*, трансформували в *N. concharum*. Отриманий рекомбінантний штаб вирощували на триптон-соевому агарі з додаванням ацетату для культивування в качалочній колбі. *N. concharum* JCM17730 (pMCS3AC) синтезував 0,11 г/л, при загальній витраті ацетату 14,58 г/л. Після чого була введена плазміда pmcs3bd, яка містить гени alsSD з *B. subtilis* і budC з *K. pneumonia* в *N. concharum* для вивчення можливості отримання мезо-2,3-буандіолу. *N. concharum* JCM17730 (pMCS3BD) показав подібні показники росту клітин і споживання ацетату. Кінцева концентрація мезо-2,3-буандіолу склала 0,11 г/л, в той час, як ацетоїн не був виявлений. Ці результати показали, що гетерологічний шлях біосинтезу ацетоїну і мезо-2,3-буандіолу може бути функціонально експресований в *N. concharum*, однак титри продукції були дуже низькими.

Описано, що при використанні ацетату як джерела вуглецю, потік вуглецю, обмежувався циклом лимонної кислоти і гліюксилатним шунтом, що могло бути викликано низькою доступністю попередника пірувату для синтезу ацетоїну і мезо-2,3-буандіолу. Малатдегідрогеназа каталізує перетворення малату в піруват і таким чином виводить вуглецевий потік з циклу лимонної кислоти. Тому було надекспресовано малатдегідрогеназу, щоб оцінити її потенціал у підвищенні внутрішньоклітинних піруватних пулів для поліпшення виробництва ацетоїну і мезо-2,3-буандіолу. Ген *maeA*, який кодує НАД залежну малатдегідрогеназу в *E. coli*, був

клонований, експресувався з ацетоїном і мезо-2,3-бутандіолом для побудови плазмід рMCS3AC-maeA і рMCS3BDmaeA відповідно.

Культивування в качалочній колбі проводилось для оцінки впливу надекспресії maeA на ріст клітин, споживання ацетату і виробництво ацетоїну/мезо-2,3-буандіолу. Кінцева концентрація ацетоїну склав 0,56 г / л, що значно вище, ніж у контрольного штаму *N. concharum* JCM17730 (рMCS3AC) без надлишкової експресії maeA. Подібний феномен спостерігався також для синтезу мезо-2,3-бутандіолу, а надекспресія гена maeA поліпшила продукцію мезо-2,3-бутандіолу з 0,11 до 0,38 г / л. Тому дослідження малатдегідрогенази для посилення утворення пірувату розглядалася як ефективна стратегія поліпшення ацетоїну і мезо-2,3-бутандіолу з використанням ацетату в якості джерела вуглецю[38].

Батіз до Кармо Діас (Федеральний університет Ріо-де-Жанейро) описав шлях отримання 2,3-бутандіолу при культивуванні бактерії *Paenibacillus brasiliensis*. В роботі було сконструйовано 15 гено-модифікованих штамів *P. brasiliensis*, штам *P. brasiliensis* PB24 був обраний оскільки він виробляє найбільшу кількість 2,3-бутандіолу. Так було знайдено принаймні, шість генів, пов'язаних з шляхом 2,3-бутандіолом, в чотирьох різних локусах. Ці гени можуть бути класифіковані як alsL (K01652, що кодує ацетолактатсинтазу) і alsS (K01653, що кодує ацетолактатсинтазу) в одному і тому ж опероні (локус MF996568, ORFs PB24_112 і pb24_111), зі збереженим синтаксином. Другий локус (MF996571) включає в себе другу копію alsL (K01652, PB24_5208) і сусіднього alsD (K01575, PB24_5209, що кодує ацетолактат-декарбоксілазу), з синтенцією, що зберігається у *P. brasiliensis*, *P. terrae* і *P. polymyxa*. Третій локус (MF996569) містить ген butB (K00004, PB24_3312, що кодує R,R-2,3-бутандіолдегідрогеназу/мезо-2,3-бутандіол-дегідрогеназу / діацетілредуктазу) і демонструє синтенія між *P.*

brasilensis і *P. polymyxa* CR1. Четвертий локус MF996570 включає ген *butA* (K03366, PB24_4054, що кодує S-, S-2,3-бутандіолдегідрогеназу / мезо-2,3-бутандіолдегідрогеназу/діацетилредуктазу), причому сентенція зберігається тільки між *P. brasilensis* і *P. terrae*. HPL-003 серед 11 геномів *Paenibacillus*, оцінених за базою даних MGcV.

Був описаний шлях перетворення глюкози в 2,3-бутандіол. Таким чином починаючи з генерації S-2-ацетолактату з двох конденсованих піруватних молекул ферментом ацетолактатсинтазою, дві субодиниці якої кодуються генами *alsL* і *alsS*. S-2-ацетолактат може бути перетворений на діацетил шляхом спонтанного декарбоксілювання в присутності кисню або в R-ацетоїн за допомогою ферменту ацетолактат декарбоксілази, кодованого геном *alsD*. Утворення діацетилю відбувається в присутності кисню, фермент діацетилредуктаза (кодується *butA*) перетворює його в S-2-ацетоїн шляхом його відновлення в присутності НАДН. S-2-ацетоїн перетворюється на мезо-2,3-бутандіол ферментом R-2,3-бутандіолдегідрогеназою (кодується геном *butB*). У присутності НАДН R-2,3-бутандіолдегідрогеназа перетворює діацетил в R-2-ацетоїн. За відсутності кисню утворення R-2,3-бутандіолу в присутності НАДН шляхом відновлення R-2-ацетоїну, здійснюваного R-2,3-бутандіолдегідрогеназою. Ця реакція є оборотною, тому в присутності НАД+ R-2-ацетоїн може утворюватися з R-2,3-бутандіолу. Крім того, R-2-ацетоїн може бути перетворений в мезо-2,3-бутандіол за допомогою s-2,3-бутандіолдегідрогенази. Крім кодування діацетилредуктази, ген *butA* також відповідає за експресію s-2,3-бутандіолдегідрогенази, яка може направляти шлях для продукції S-, S-2,3-бутандіолу і мезо-2,3-бутандіолу. Щоб довести одночасне отримання трьох 2,3-бутандіол-ізомерів під час ферментації цукру в *P. brasilensis*, використовуючи газову хроматографію.

Спостерігалася тільки продукція R-2,3-бутандіолу і мезо-2,3-бутандіолу, що свідчить про те, що s-2,3-бутандіолдегідрогеназа не експресується в умовах росту, протестованих в цьому дослідженні.

Було зазначено, що загальна концентрація 2,3-бутандіолу для 15 досліджуваних штамів *Paracoccidioides brasiliensis* варіювала від 5,5 до 7,6 г/л після 8 год вирощування при 32 °С в модифікованому середовищі YEPD, що містить 20 г/л глюкози. Найбільшу кількість 2,3-бутандіолу продукував штам PB24. Вихід 2,3-бутандіолу у даного штаму складала 8,2 г/л 2,3-бутандіолу після 12-ти годин культивування, продуктивності 0,68 г/л/год. Збільшення продукції 2,3-бутандіолу штамом PB24 спостерігалось при використанні більш високих концентрацій глюкози, досягаючи 27 г/л загального 2,3-бутандіолу в YEPD, що в своєму складі містила близько 80 г/л глюкози, культивування проводили протягом 72-годин. Дослідниками був секвенований геном *P. brasiliensis* PB24 і виявили, принаймні, шість генів, пов'язаних з 2,3-бутандіолом в чотирьох різних локусах. Також було порівняно послідовності генів, що відносяться до шляху 2,3-бутандіолу в *P. brasiliensis* PB24 з іншими спороутворюючими бактеріями і виявив сильну схожість з генами, пов'язаними з виробництвом 2,3-бутандіолу у *P. polytuxa*, *P. terrae* і *P. peoriae*[37].

Висновок: Отримання 2,3-бутандіолу є затребуваним, оскільки на даний час його активно використовують в харчовій та фармацевтичній промисловості через те, що він володіє сильним жирним запахом вершкового масла та сметани, і практично позбавлений смаку. Одна з перших робіт була написана південно корейським вченим Соу-Джу Кіма. В дослідженні описані метод генетичної модифікації *S. cerevisiae* для підвищення виходу 2,3-бутандіолу. *S. cerevisiae* BD5_G1CtPDC1_nox, Pdc, bd2_mth1, культивували на поживному середовищі з цукрів, отриманих з відходів виробництва,

таких як ксилоза, целобіоза і галактоза. В роботі китайського дослідника Ве Лінгу описані перспективи виробництва 2,3-бутандіолу, використовуючи водорості *N. concharum* JCM17730. Був розроблений і описаний шлях біосинтезу ацетоїну і мезо-2,3-бутандіолу *N. concharum* JCM17730. Зазначалось, що отримання 2,3-бутандіолу з використанням *N. concharum* JCM17730 може стати альтернативою культивування традиційних мікроорганізмів, оскільки він використовує ацетат, який є вторинною сировиною. Бразильський вчений Батіз до Кармо Діас описав отримання 2,3-бутандіолу, використовуючи генно-модифіковану бактерію *P. brasilensis* PB24. В роботі описані методи конструювання генно-модифікованого штаму *P. brasilensis* PB24, а також оптимізації умов біосинтезу для отримання максимальної концентрації 2,3-бутандіолу.

Біосинтез 2,3-бутандіолу бактеріями та дріжджами

Продуцент	Поживне середовище	Концентрація цільового продукту, г/л	Сфера практичного використання	Література
<i>S. cerevisiae</i> BD5_G1CtPDC1_pox	Глюкози	154,3	харчова,	[36]
<i>S. cerevisiae</i> Pdc	Целобіоза	5,29	фармацевтична	
<i>S. cerevisiae</i> bd2_mth1	Водорості, глюкоза, галактози.	100	промисловість	
<i>N. concharum</i> JCM17730	Ацетат, дріжджовий екстракт, триптон, NaCl, KCl, MgCl ₂ ×6H ₂ O, MgSO ₄ ×7H ₂ O, CaCl ₂ ×2H ₂ O , NaHCO ₃ , ампіцилін	0,58	харчова, фармацевтична промисловість	[38]

Закінчення таблиці 3.2

<i>P.brasilensis</i> PB24	Модифіковане середовище YEPD (глюкоза, дріжджовий екстракт, K ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ , MnSO ₄ , KCl)	27 г/л	харчова, фармацевтична промисловість	[37]
---------------------------	--	--------	--------------------------------------	------

1.2.3. Отримання фенілетанолу.

Фенілетанол - це поширена та значуща ароматична сполука в парфумерній і харчовій промисловості, роботи з отримання цієї сполуки альтернативними шляхами активно здійснюються в світі. Фенілетанол також можуть використовувати як сировину для отримання інших важливих ароматичних сполук, таких як 2-фенілацетат та потенційні молекули палива, фенілацетальдегід і гідроксифенілетанол [11,12,13]. В 1990 ринок фенілаетанолу складав 7000 тон, за наявних даних виробництво фенілетанолу оцінюють в 10 000 тон на рік, що здійснюється хімічним синтезом [27]. Ціна на фенілетанол, отриманий з рослин, складає 1000 доларів за кілограм, хімічно синтезований 5 доларів за кілограм [11,14]. На сьогодні розробляються біотехнологічні методи отримання фенілетанолу, що може бути ефективним альтернативним методом виробництва фенілетанолу [50].

Одне з перших досліджень з отримання фенілетанолу з максимальним титром 5,6 г/л описане німецькою вченою Марією Ештман (Інститут мікробіології Франкфурт). В даній роботі описані методи оптимізації процесу отримання фенілетанолу як цільового продукту на середовищі з меляси при біоконверсії l-фенілетанолу використовуючи штам *Kluyveromyces marxianus* CBS 600. В даній роботі розглядався комплексний інженерний підхід по підвищенню синтезу фенілетанолу, який включав як отримання максимально придатного середовища, так і вплив температур і рН на синтез цільової сполуки. Експериментально було показано, що оптимальна температура для біосинтезу становила 35 °С, в якості джерела вуглецю була використана меляса. При оптимізації середовища було доведено, що максимальна концентрація фенілетанолу (5,6 г/л) отримується під час біоконверсії l-фенілетанолу (9 г/л). При цьому зазначалось, що велике значення має температура культивування. Так, при 32,5 °С концентрація фенілетанолу склала 3,88 г/л через 24 години і 4,40 г/л через 39 годин. При зростанні температури підвищення виходу продукту

склало до 29% (24 години) і 47% (39 годин) відповідно. Загалом під час оптимізації середовища було підвищена концентрація фенілетанолу на 87% порівняно з неоптимізованим середовищем [22].

Також розглядалися можливість отримання фенілетанолу, використовуючи гліцерин як джерело вуглецю. В такому випадку вихід фенілетанолу склав 0,77 г/л при культивуванні *Yarrowia lipolytica* NCYC3825. Дані дослідження проводилися польською вченою Евеліною Целінською (Університет природничих наук в Познані). Шість різних штамів *Y. lipolytica* (A101.1.31, A18, A15, B57-4, МК1, A101) культивували для того, щоб перевірити їх здатність виробляти фенілетанол. У чотирикультурних супернатантах аналізованих штамів було виявлено фенілетанол: A101.1.31: 0.24 г / л, A18: 0,02 г / л, B57-4: 0,04 г / л, A15: 0,01 г / л. Для двох інших продуцентів: МК1 та A101— здатності утворення фенілетанолу не виявлено. Таким чином, виявилось, що здатність продукувати фенілетанол на виявленому рівні не є однорідною серед цих штамів *Y. lipolytica*, а ефективність виробництва залежить від штаму. Отже, кінетика утворення фенілетанолу при культивуванні на глюкозі як джерелом вуглецю була найкращою при культивуванні штаму *Y. lipolytica* NCYC3825, оскільки для інших штамів дріжджів фенілаланін утворюється в основному як продукт біоконверсії фенілетанолу по шляху Ерліха. При цьому зазначалось, що при використанні середовища з глюкозою як джерелом вуглецю, вихід фенілетанолу буде на порядок вище, ніж при культивуванні на середовищі з гліцерином - 1,98 г/л. Низьку конверсію фенілаланіну до фенілетанолу в присутності гліцерину, можливо, можна пояснити використанням фенілаланіну у шикіматному шляху, що становить одну з декількох можливостей деградації молекул фенілаланіну у дріжджових клітинах. Фенілаланін, ймовірно, використовувався швидкозростаючими клітинами, які знаходились у логарифмічній фазі зростання між 10 та 24 год [23].

Кімом Босом (Сеульський національний університет) були проведені дослідження з використання стратегії метаболічної інженерії над штамом *Saccharomyces cerevisiae* W303-1B. Дослідники виявили гени, що каталізують L-фенілаланін (L-Phe) до фенілпірувату (трансаміназа Aro9) та декарбоксілюють фенілпіруват до фенілацетальдегіду (декарбоксилаза Aro10). У клітинах дріжджів фенілацетальдегід може окислюватися до фенілацетату (PAA), конкуруючи з утворенням 2-фенілетанолу. Було виявлено, що за окиснення фенілацетальдегіду до фенілацетату відповідає фермент альдегід-дегідрогеназа (Ald3). На основі отриманих даних автори роботи сконструювали штам дріжджів, з геному якого було вилучено ген Ald3 та індукована надекспресія ферменту амінотрансферази (ARO9 та ARO10). В результаті штам *S. cerevisiae* W303-3 синтезував 4,8 г/л 2-фенілетанолу на середовищі, що містило 10 г/л L-фенілаланіну в якості єдиного джерела азоту. Автори зазначили, що така кількість фенілетанолу є токсичною для клітин продуцента. З метою зменшення негативних впливу високих концентрацій цільового продукту на клітини дріжджів-продуцентів, автори здійснили двохфазне культивування *S. cerevisiae* JHY315 з додаванням поліпропіленгліколю. Пропіленгліколь виступив у якості екстрагента, в який синтезований 2-фенілетанол переходив під час біосинтезу, таким чином його концентрація в культуральній рідині зменшувалась. В результаті двохфазного культивування *S. cerevisiae* JHY315 синтезував вищу кількість фенілетанолу - 6,8 г/л порівняно з однофазним культивуванням - 4,8 г/л, та у 9 разів вищу кількість ніж вихідний штам[24].

Висновок: На сьогоднішній день проводяться дослідження з отримання фенілетанолу, оскільки фенілетанол розповсюджена сполука, яку використовують як ароматичну речовину в харчовій і парфумерній промисловості. В свою чергу ціна фенілетанолу, який отримували з рослин не задовольняє потреб ринку. В одному з перших досліджень отримання фенілетанолу був описаний німецькою вченою Марією Ештман. В дослідженні

описувались методи оптимізації процесу отримання фенілетанолу як цільового продукту на середовищі з меляси при біоконверсії 1-фенілетанолу використовуючи штам *K. marxianus* CBS 600. В роботі польської вченої Евеліни Целінської розглядалися можливість отримання фенілетанолу використовуючи гліцерин як джерело вуглецю при культивуванні генно-модифікованого штаму *Y. lipolytica* NCYC3825. В роботі корейського дослідника Кіма Боса було описано отримання фенілетанолу з використання стратегії метаболічної інженерії над штамом *S. cerevisiae* JHY315.

Біосинтез фенілетанолу бактеріями та дріжджами

Продуцент	Поживне середовище	Концентрація цільового продукту, г/л	Сфера практичного використання	Література
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 600	Цукрова патока, фенілаланін, MgSO ₄ , Na ₂ HPO ₄ , лимонна кислота, YND	5,6	харчова, парфумерна промисловість	[22]
<i>Yarrowia lipolytica</i> NCYC3825	Глюкоза, Дріжджовий екстракт, KH ₂ PO ₄ , MgSO ₂ ×H ₂ O, дріжджова азотна основа, розчин мікроелементів, тіамін	1,98	харчова, парфумерна промисловість	[23]
<i>S. cerevisiae</i> JHY315	Глюкоза, дрожжевая азотная база, суміш 20 незамінних амінокислот,	6,8 4,1	харчова, парфумерна промисловість	[24]

1.2.4. Отримання γ -декалактону

Лактони - це циклічні ефіри, одержувані з молочної кислоти, які мають маслянисто-персиковий аромат, і входять до складу найрізноманітніших ефірних масел та рослинних летких речовин [23, 24]. Вони добре відомі своєю великою різноманітністю смаку та аромату. На сьогодні є висока потреба в розробці біотехнологічного методу отримання γ -декалактону, оскільки дану сполуку виробляють в кількості 7000 тон кожен рік. З моменту впровадження його біотехнологічного отримання ціна з 1000 доларів за кілограм знизилась до 300 доларів[25].

В роботах Аделаїда Брага (Університет Ньютона Гомеса в Авейру) описано процеси отримання декалактону з метилрціноліату або кастрового масла в невеликих об'ємах, оптимізація отримання декалактону в великих об'ємах [26,27,28]. Було встановлено, що ефективність модифікованих штамів *Y. Lipolytica* полягає в їх метаболізмі ліпідів, особливо на шляху β -окислення (штам MTLY40-2P, порушений в нативних генах POX2-5 і експресуючий ген, що кодує Aox2p) або при гідролізі тригліцеридів (штам JMY3010, надекспресія Lip2p) з використанням кастрової олії в якості субстрату в лабораторному біореакторі. Використовуючи поетапні культивування з підживленням штаму *Y. lipolytica* MTLY40-2P, була досягнута концентрація γ -декалактону 7 г/л [27,28]. В тому ж дослідженні виявили вплив позаклітинної ліпази на швидкість синтезу γ -декалактону, за рахунок швидкого гідролізу кастрового масла [28,29,32].

У роботі Нельма Гомес (Університет Мінхо) для біосинтезу γ -декалактону у якості джерела вуглецю - використовували кастрову олію. Автори відмітили, що ріст дріжджів-продуцентів *Y. lipolytica* W29 та синтез γ -декалактону є досить повільним при використанні кастрової олії у зв'язку з низькою активністю ліпаз, синтезованих дріжджами. Було

запропоновано вдосконалити синтез γ -декалактону шляхом виявлення концентрації касторової олії, при якій активність ліпаз, відповідно – швидкість біосинтезу та концентрація цільового продукту будуть найвищими. Встановлено, що найвищу активність ендогенні ліпази проявляли за найнижчої концентрації касторової олії – 10 г/л. В той же час, найбільша кількість γ -декалактону (1,8 г/л) отримувалась при внесенні олії в концентрації 30 г/л. При цьому тривалість біосинтезу була значною – 160 год. Тому, на другому етапі досліджень, біосинтез γ -декалактону проводили у 3-ох варіантах: перший – із внесенням ліпази до поживного середовища, із подальшою інокуляцією біомаси, другий варіант передбачав одночасну інокуляцію дріжджів з внесенням екзогенної ліпази та третій варіант (контрольний) – без додавання ліпази. Було встановлено, що додавання екзогенної ліпази скорочувало тривалість лаг-фази при рості біомаси, проте рівень γ -декалактону за таких умов знижувався порівняно з контролем – він склав 1 г/л, тоді як для контролю – 1,5 г/л. Автори пояснюють це вивільненням жирних кислот в результаті дії екзогенних ліпаз, високі концентрації яких є токсичними для продуцента[33].

В роботі Гесіція Сореса (Федеральній університет Лавранса) описано отримання γ -дельталактону при культивуванні *Y. lipolytica* ССМА0357 і *Lindera saturnus* ССМА 0243 на середовищі з неочищеним гліцерином і касторовою олією в якості субстрату. В результаті *L. saturnus* ССМА синтезував вищу концентрацію дельталактону при вирощуванні на гліцерині (5,8 г/л), в той час як штам *Y. Lipolytica* ССМА0357 досяг кращих результатів при вирощуванні на касторової олії (3.5 г/л). В дослідженні було показано, що при культивуванні на 10% неочищеному гліцерині *L. saturnus* ССМА 0243 синтезував в 2,7 рази більше γ -декалактону ніж при культивуванні на касторовому маслі і в 2,5 рази більше, ніж *Y. lipolytica*

ССМА 0357 в неочищеному гліцерині. Таким чином *L. saturnus* ССМА 0243 синтезує більшу кількість γ -декалактону використовуючи гліцерин в якості джерела вуглецю і це робить економічно вигіднішим ніж *Y. lipolytica* ССМА0357. Технологія отримання γ -декалактону шляхом культивування *L. saturnus* ССМА включає низку переваг: економічну – за рахунок низької вартості неочищеного гліцерину, при рості на якому *L. saturnus* ССМА синтезує значну кількість γ -декалактону та екологічну – можливість ефективної утилізації побічного продукту виробництва біодизелю [35].

Висновок: Отримання γ -декалактону альтернативними методами є дуже потрібна оскільки її використовують в великих об'ємах, а запроваджені вже технології отримання змогли суттєво зменшити ціну, з 1000 доларів за кілограм до 300. Так, біотехнологічно отриманий γ -декалактон коштує 300 доларів за кілограм, в той час як γ -декалактон отриманий класичними методами - 1000 доларів. Так, в роботі португальського вченого Гесіція Сореса описано отримання γ -декалактону при культивуванні *Y. lipolytica* ССМА0357 і *L. saturnus* ССМА 0243 на середовищі з неочищеним гліцерином і касторовою олією в якості субстрату. В роботі португальського вченого Нельма Гомеса описане отримання γ -декалактону з використанням в якості джерела вуглецю касторової олії. В роботі були проведені дослідження по оптимізації умов біосинтезу для отримання максимальної концентрації γ -декалактону.

Біосинтез γ -декалактону дріжджами

Продуцент	Поживне середовище	Концентрація цільовго продукту, г/л	Сфера практичного використання	Література
<i>Yarrowia lipolytica</i> MTLY40-2P	YND, NH ₄ Cl, Tween 80 або касторова олія.	7	харчова, парфумерна промисловість	[28]
<i>Yarrowia lipolytica</i> W29	YPDA, касторова олія, NH ₄ Cl, Tween 80	1,5	харчова, парфумерна промисловість	[33]
<i>Lindnera saturnus</i> CCMA 0243	Касторова олія, Гліцерин,	5,8 3,5	харчова, парфумерна промисловість	[34,35]
<i>Yarrowia lipolytica</i> CCMA0357	Середовище YND, NH ₄ Cl, Tween 80			

1.2.5. Отримання лімонену.

Лімонен - один з найважливіших та найпоширеніших терпенів у галузі смаку та аромату[4,5,6]. Найчастіше лімонен використовують в харчовій промисловості, виробництві парфумерної продукції і миючих засобів[19,45]. На сьогодні є повідомлення про негативний вплив бактеріальної хвороби цитрусових на врожай відповідних культур. Оскільки цитрусові є основним природним джерелом лімонену, суттєве скорочення їх кількості спричинило ріст ціни на ароматизатор в усьому світі. Відповідно, вразливість рослин, які є основною сировиною для отримання лімонену, стимулює перехід від обробки натуральної сировини до альтернативних, зокрема до біотехнологічних методів отримання[27].

Одним з перших досліджень було здійснено Ксуан Као (Східно-Китайський університет науки і техніки) в якому був описаний спосіб отримання лімонену за допомогою генно-модифікованого штаму *Yarrowia lipolytica* Po1f-LN-051. Для цього було проведено експресію генів з *S. cerevisiae* в *Y. lipolytica*. Для побудови синтетичного шляху лимонену в *Y. lipolytica* Po1f-LN-05 були вбудовані гени, що кодують нерилдифосфатсинтазу 1 (NDPS1) від *Agastache rugosa* та лімоненсинтазу (LS) від *Solanum lycopersicum*. Усічені гени були названі *tLS* і *tNDPS1*, відповідно. Ген *tLS* і ген *tNDPS1* були клоновані в вектор p1312 з праймерами P1/P2 і P3/P4 для отримання векторів p1312-tLS і p1312-tNDPS1 відповідно. Потім плазміда P-tLS-T була клонована в вектор p1312-tNDPS1 з праймерами P5/P6 для отримання вектора p1312LN. Гени *HMG1*, *ID11*, *ERG8*, *ERG10*, *ERG12*, *ERG19* ампліфіковані з генома Po1f з *МЛС* та *tNDPS1* були клоновані в p1269 з використанням праймерів P7/P8, P9/P10, P11/P12, P13/P14, P15/P16, P17/P18, P1/P2, та P3/P4 отримати відповідні вектори p1269HMG1, p1269ID11, p1269ERG8, p1269ERG10,

p1269ERG12, p1269ERG19, p1269tLS, p1269tNPDS1. Потім вектори P-tHMG1-T, P-HMG1-T, P-IDI1-T, P-ERG8-T, P-ERG10-T, P-ERG12-T, P-ERG19-T, P-tLS-T і P-tNDPS1-T були клоновані в p1269thmg1, p1269HMG1, p1269IDI1 з праймерами P19/P20 для отримання векторів p1269tHMG1tHMG1, p1269hmg1hmg1, p1269idi1idi1, P1269HMG1TLS і P1269HMG1TNPDS1, P1269HMG1ERG8, P1269HMG1ERG10, P1269HMG1ERG12, p1269hmg1erg19, p1269hmg1idi1 відповідно. Після чого касети експресії P-tHMG1-T і P-IDI1-T були клоновані в вектори p1269tHMG1tHMG1 і p1269IDI1IDI1 з праймерами P21/P22 для отримання векторів p1269tHMG1tHMG1tHMG1 і p1269IDI1IDI1IDI1. Всі плазмиди були побудовані з використанням набору для клонування One Step від компанії Vazyme Biotech Co. Крім того, для максимізації вироблення лімонену кілька генів, що беруть участь у мевалонатному шляху (MVA), були надекспресовані або в різних копіях одного гена, або в комбінації. З оптимізованою концентрацією піровиноградної кислоти та додекану в остаточному інженерному штамі Po1f-LN-051 було досягнута максимальна концентрація лімонену 23,56 мг/л та 1,36 міліграм продукту на грам маси сухої клітини на середовищі такого складу: дріжджовий екстракт, пептон, дистильована вода, декстроза і піровиноградна кислота, що демонструє приблизно 226-кратне збільшення порівняно з початковим виходом 0,006 міліграм продукту на грам маси сухої клітини[14].

В роботі Фіони Давієс (Колорадська гірничо-шахтарська школа) описувалась технологія отримання лімонену використовуючи генетично модифіковану ціанобактерію *Synechococc sp.* PCC 7002.

Для створення генномодифікованого штаму *Synechococc sp.* PCC 700 ген 4S-Лімонен-синтази, який вилучили з *Mentha spicata*, був оптимізований для використання кодону в *Synechococcus sp.* PCC 7002,

отриманий кодон називається MsLS. Після чого отриманий вектор був вставлений у *Synechococcus sp.* PCC 7002. Перші 168 основ Q40322, що кодують аденозинтрифосфат, були замінені кодоном ATG для ініціювання трансляції в *Synechococcus sp.* PCC 7002, зберігаючи залишки R58 / R59, необхідні для каталітичної активності. Ген α -бісаболен-синтази з *A. grandis* (GenBank O81086) також був оптимізований для використання кодону в *Synechococcus sp.* PCC 7002 і називається AgBIS. Ці послідовності були клоновані у плазмиду pAQ1, що містить *Synechocystis sp.* промотор PCC 6803 srcBA (src). Трансгени MsLS та AgBIS разом із касетою стійкості до спектроміцину (SmR) були клоновані між NSI-фланкуючими областями безпосередньо після промотору PCC 6803 srcBA, генеруючи плазмиди pNSI-src-MsLSSmR та pNSI-src-AgBIS-SmR. Олігонуклеотидні праймери, які використовуються для ампліфікації даних генів, оптимізованих кодоном:

MsLS (MsLS_NcoI_F, 50 - CTTCGCTGAACCatgGAACGTCGCTC-30 і MsLS_Sam - TGACGGGATCCttaAGCGAAGG-30) AgBIS (AgBIS_NcoI_F, 50 - AGATTAATTCCatgGCCGGTGTGA-30 і AgBIS_BamHI_R, 50 - GCCGGATCCttaTAACGGCAAC-30). Нейтральний сайт (НСІ) для інтеграції трансгенів був визначений у *Synechococcus sp.* PCC 7002 між двома рамками зчитування, що кодують гіпотетичні білки (SYNPCC7002_A0935 та SYNPCC7002_A0936), які були названі NSI. NSI було використано як місце інтеграції для генів лімонен-синтази (MsLS) та α -бісаболен-синтази (AgBIS). Щоб продемонструвати, що будь-які фенотипи, що виникають в результаті експресії MsLS або AgBIS, не були прямим результатом втручання в область нейтрального сайту для інтеграції трансгенів (NSI) *Synechococcus sp.* PCC 7002 геномної ДНК була

сконструйована контрольна плазміда pNSI-crc-YFP-SmR, що містить ген YFP замість генів MsLIM або AgBIS терпен синтази (TPS).

Отриманні гено-модифіковані штами вирощували фотоавтотрофно в партіях по 100 мл з оптичною щільністю $OD_{730\text{ nm}} = 2,0$.

Кількісне визначення лімонену проводили за допомогою стандартних кривих, побудованих за допомогою піків отриманих на газовому хроматографі з серійних розведень стандартів лімонену та альфа-бісаболену у відповідному розчиннику. Через зворотний ефект розчинника, лімонен спостерігався як широкий пік на хроматограмі при змішуванні з додеканом. Розведення зразка розчинником меншої молекулярної маси, ніж розчинник, зазвичай усуває цю проблему. Однак розведення підштовхувало лімонен до меж виявлення в деяких зразках, і тому піки лимонена були інтегровані, використовуючи площу, виміряну під широким піком лімонену. Кінцева концентрація лімонену становила 4 мг/л. Зазначалось, що для підвищення синтезу лімонену потрібно підвищити рівень біомаси, не пригнічуючи при цьому синтез цільової сполуки[15].

В роботах Крістіана Вірлборда (Технічний університет Дортмунда) були описані методи отримання лімонену шляхом культивування генно-модифікованого штаму *Escherichia coli* BL21 і підвищення його виходу лімонену. Штам *Escherichia coli* BL21 є генно-модифікованим штамом, який був сконструйований за допомогою перенесення генів лімоненсинтази (LS) від *Mentha spicata* та геранілпірофосфат GPP синтази 2 (AGPPS2) від *Abies grandis*. Для цього було сконструйовано вектори експресії pBAD:LS і pET24:AGPPS2. Ці дві системи були обрані, оскільки раніше повідомлялось, що їх використання призводило до функціональної експресії синтезу геранілпірофосфату (GPP) та синтезу лімонену без оптимізації кодону в *E.coli*.

Безмембранні екстракти готували з індукованих клітин *E. coli* BL21 які містили або pBAD: LS/pET24: AGPPS2, або pBAD: LS/pET24: KO. З геранілпірофосфатом (GPP) як субстратом спостерігалась активність 1,6 та 3,6 мкг білка. При використанні IPP та DMAPP, активність в двухстадійний біоконверсії складала 0,13-0,15 мкг білка.

Оптимізація синтезу лімонену у *E.coli*.

Першою стратегію оптимізації біосинтезу було підвищення доступності попередників, зазначалось, що така стратегія була успішною для виробництва сесквітерпена аморфа-4,11-дієна в *E. coli*, а зовсім недавно також застосовувалася до виробництва лімонену. Для підвищення внутрішньоклітинної доступності попередників ізопентенил-пірофосфат (IPP) та диметилаліл-пірофосфат (DMAPP) було введено ортологічний шлях мевалонату (MVA) від *Saccharomyces cerevisiae*. Всі гени мевалонового шляху, які перетворюють ендогенний ацетил-CoA в ізопентенил-пірофосфат (IPP) та диметилаліл-пірофосфат (DMAPP), були зібрані в плазміді pMVAidi. Друга плазміда pTAC:LS:AGPPS2 містила гени LS та AGPPS2. Три штами *E. coli* (DH5a, JM101 та MG1655) та штам *E.coli* BL21 (DE3) в які були вбудовані плазміді pMVAidi та pTAC: LS: AGPPS2 після чого їх культивували у присутності діізононіл фталату (DNIP). Таким чином було досягнуто збільшення виходу лімонену у 60 раз і порівняно з початково сконструйованими штамми. Цей результат підтверджував, що постачання ендогенного попередника є обмежуючим фактором для синтезу лімонену.

Вплив ацетату на синтез лімонену

У штаммах *E.coli* BL21 спостерігалась різна кінетика утворення лімонену, виявилось, що концентрація ацетату корелює з рівнем утворення лімонену. Так штам *E.coli* DH5a синтезував найбільшу кількість ацетату

(5,25 г/л) і одночасно синтезував найвищу концентрацію лімонену через 30 год ($19,53 \pm 0,75$ мг/л). *E. coli* JM101 синтезував низькі кількості ацетату (3,22 г/л), і дав найнижчу концентрацію лімонену через 30 год ($10,88 \pm 0,43$ мг/л). Концентрації біомаси $1,69$ Г_{густина щільності заряду}/л для *E. coli* JM101 та $1,54$ Г_{густина щільності заряду}/л для *E. coli* DH5 α були подібними для обох штамів, але швидкість поглинання глюкози під час логарифмічного росту була найбільшою для *E. coli* JM101 ($\sim 2,4$ ммоль Г_{густина щільності заряду}/год). Для того, щоб перевірити, чи впливало утворення ацетату на утворення лімонену, було досліджено штам *E. coli*, у якого не було гену фосфотрансацетилази (pta), який перетворює ацетил-КоА в ацетилфосфат. *E. coli* MG1655 DE3 (Δ pta, Δ ldhA, Δ adhE) (pMVAidi, pTAC: LS: AGPPS2) продукував менше лімонену ($9,07 \pm 0,34$ г/л) і менше ацетату (0,85 г/л), ніж штам з функціональним геном pta в тих же експериментальних умовах. Відсутність функціонального гена pta та отримані внаслідок цього фізіологічні властивості клітини перешкождали збільшенню потоку метаболітів у напрямку вироблення лімонену.

З метою досягнення максимальної концентрації лімонену на дешевому джерелі вуглецю *E. coli* BL21 (DE3) (pMVAidi, pTAC: LS: AGPPS2) культивували в ферментері об'ємом 3,1 л з подачею в партії з глюкозою або гліцерином як джерелом вуглецю та D1NP як органічним розчинником-носієм (співвідношення фаз 1: 2). З гліцерином як єдиним джерелом вуглецю була досягнута кінцева концентрація лімонену 2,7 г/л протягом 45 год, що в 3,9 рази вище, ніж кінцева концентрація лімонену, досягнута з використанням глюкози як джерело вуглецю (0,69 г/л). Крім того, було досягнуто 26% вищої кінцевої концентрації біомаси $61,8$ Г_{густина щільності заряду}/л з гліцерином, ніж з глюкозою ($49,1$ Г_{густина щільності заряду}/л). Це пояснюється невстановленою метаболічною інактивацією клітин при культивуванні на

глюкози (накопичення глюкози). При культивуванні на гліцерині такого ефекту не спостерігалось і утворення лімонену було постійним протягом всього періоду ферментації Отриманий вихід сягав 2,7 г/л через 45 годин культивування[16,17].

Висновок: Лімонен - один з найпоширеніших терпенів які використовуються в виробництві харчових, фармацевтичних та парфумерних виробів. На сьогодні є нагальна потреба в розробці альтернативного шляху отримання даної сполуки, оскільки є дефіцит даної сполуки на ринку. Один з перших досліджень, який був присвячений отримання лімонену біотехнологічним методом було дослідження китайського вченого Ксуан Као, в якому був описаний спосіб отримання лімонену за допомогою генномодифікованого штаму *Y. lipolytica* Po1f-LN-051. Також отримання лімонену за допомогою ціанобактерій описувалось американською дослідницею Фіоною Давієс. В роботі було описано як за допомогою генномодифікованого *Synechococcus sp* PCC 7002. Для створення генномодифікованого штаму ген з *Mentha spicata* і ген від *Abies grandis*, були вставлені в плазмиду pNSI-cpc-YFP-SmR яка була інтегрована в *Synechococcus sp* PCC 7002. Таким чином? був сконструйований штам цінобактерії, яка може виробляти лімонен. Одна з останніх робіт, яка стосувалась отримання лімонену біотехнологічним шляхом була описана німецьким вченим Крістіаном Вірлбордом. Було описано отримання лімонену за допомогою культивування генномодифікованого штаму *E. coli* BL21, який давав найбільшу концентрацію лімонену з усіх наведених штамів.

Біосинтез лімонену бактеріями та дріжджами

Продуцент	Поживне середовище	Концентрація цільовго продукту, мг/л.	Сфера практичного використання	Література
E.coli BL21	Середовище M9, гліцерин, MgSO ₄ , Діізонанілфталат, Ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозид, US* мікроелементи	2 700	харчова, парфумерна, фармацевтична промисловість	[16]
<i>Synechococc sp.</i> PCC 7002	Na ₂ EDTA, NaCl, MgSO ₄ , KCl, CaCl ₂ ×2H ₂ O, NaNO ₃ , KH ₂ PO ₄ , Трізма басе	4	харчова, парфумерна, фармацевтична промисловість	[15]
<i>Yarrowia lipolytica</i> Po1f-LN-051	Середовище YPD, Піровиноградна кислота, Додекана	23,56	харчова, парфумерна, фармацевтична промисловість	[28]

Розділ 2. Техніко-економічне обґрунтування

2.1. Потреба у цільовому продукті

У даному курсовому проєкті пропонується використання штаму *Escherichia coli* BL21 для виробництва ароматичної сполуки – лімонену, який може використовуватися в харчовій, парфумерній, фармацевтичній і хімічній промисловості.

Згідно з наявними на сьогодні даними, ринок ароматичних речовин стрімко зростає. У 2015 році, за оцінкою компанії Euromonitor International, обсяг світового ринку ароматизаторів для продуктів харчування і напоїв склав 1156 тис тон, в 2020 він має досягти 1500 тис тон. При цьому загальний обсяг ринку ароматичних інгредієнтів оцінюється в 15 млрд євро[51].

Таким чином, згідно прогнозів компанії Freedonia Group ринок ароматичних сполук буде рости в середньому на 4,3% на рік. Разом з тим в ринку ароматизаторів спостерігається певна закономірність у поступовій відмові від використання синтетичних ароматизаторів і переході на натуральні. До цього призвела постанова Американського законодавства Food and Drugs Title 21 і Європейського регламенту CE 1334/2008[56,57].

Статистика 2014 року свідчить, що відсоток натуральних ароматизаторів в напоях становить 90% в ЄС і 80% в США, до 80% в солоних продуктах продуктах і на 50% ЄС та 75% США в молочній продукції. Таким чином, на сьогодні існує необхідність до забезпечення харчової промисловості в ароматизаторах природного походження[52].

Вітчизняний ринок харчових інгредієнтів зростає в руслі закордонного ринку, але з певним відставанням. Так, наприклад, ринок газованих напоїв, фруктових соків та нектарів виріс з 01.01.2017 по 01.01.2018 рік приблизно на

					<i>НУХТ БТЕК 02. 02. 01 КП ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Дрк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>Розділ 2. Техніко- економічне обґрунтування</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробник</i>		<i>Івасенко М.О.</i>						
<i>Керівник</i>		<i>Воронцов О.О.</i>						
<i>Н. контр</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>		<i>Пирог Т. П.</i>						

30 %. Ринок миючих засобів зростає приблизно на 3% на рік. Ринок кондитерських виробів збільшується на 25% на рік. Обсяг виробництва цитрусових ароматизаторів росте приблизно на 40% щорічно [53]. З наведених вище даних можемо зробити висновок, що ринок динамічно розвивається і проблема забезпечення його ароматичними речовинами є актуальною.

2.2. Розрахунок потужності виробництва

Станом на 2020 рік, ринок безалкогольних напоїв стрімко зростає. Один з найбільших виробників напоїв, в тому числі безалкогольних є ПрАТ «Оболонь». Згідно статистики підприємства загальна кількість вироблених солодких напоїв в 2019 році склало 26 596 тисяч декалітрів [54,55].

В асортименті напоїв ПрАТ «Оболонь» є цитрусові напої. Приймаємо, що використовувати лімонен будуть у 5% напоїв, з цього виходить що:

$$265960000 \times 5\% = 13\,298\,000 \text{ л}$$

Концентрація лімонену як ароматичної сполуки в готових výroбах складає 0,01 %, тому річна потреба в лімонені буде складати:

$$13\,298\,000 \times 0,01\% = 1\,329,8 \approx 1\,330 \text{ кг}$$

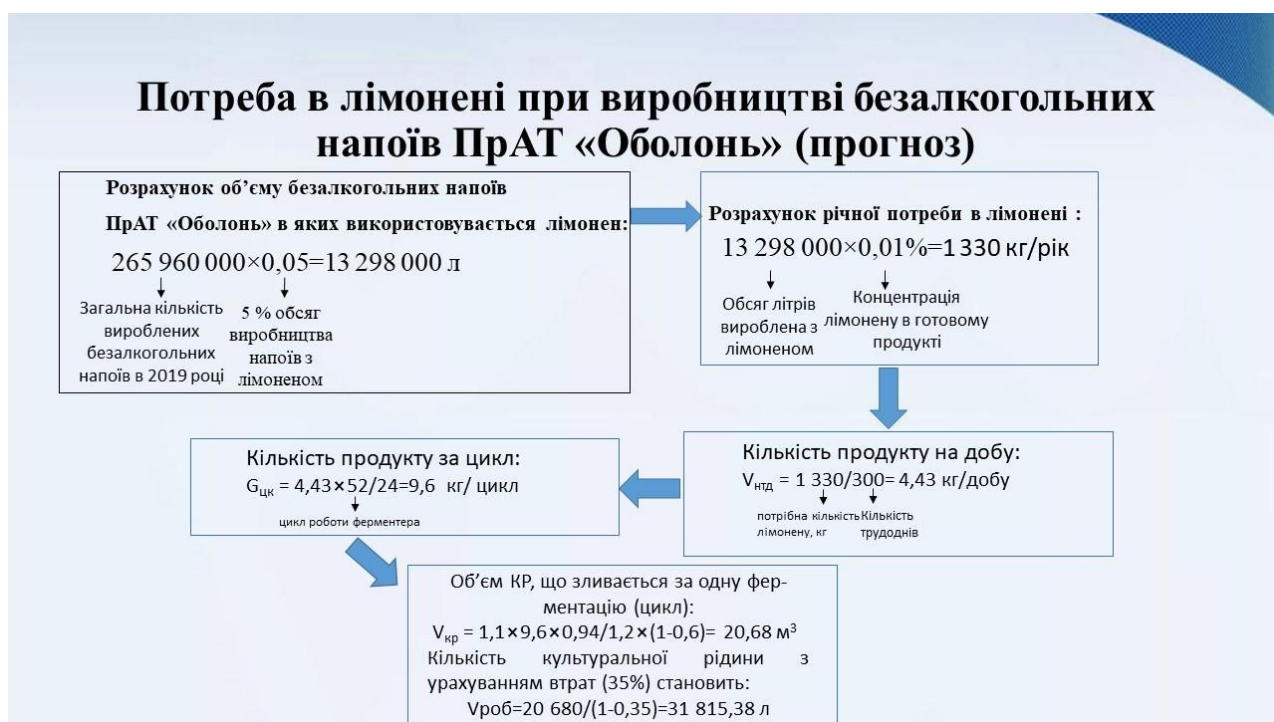


Рис 2.1. Узагальнена схема розрахунку культуральної рідини для біосинтезу ароматизатору лімонену *Escherichia coli* BL21

2.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

При рості на поживному середовищі з гліцерином *E.coli* BL21 утворює 2,7 г/л лімонену. Кількість ароматизатору яку ми маємо отримати складає 5319,2 кг. Кількість продукту на добу:

$$V_{\text{нтд}} = G_{\text{нт}}/T_{\text{рд}} = 1\ 330/300 = 4,43 \text{ кг/добу}$$

Де $G_{\text{нт}}$ – потрібна кількість лімонену, кг;

$T_{\text{рд}}$ – кількість трудоднів(приймаємо 300);

Кількість продукту за цикл:

$$G_{\text{цк}} = V_{\text{нтд}} \cdot T_{\text{цф}}/24 = 4,43 \times 52/24 = 9,6 \text{ кг/цикл.}$$

де $T_{\text{цф}}$ – цикл роботи ферментера.

Об'єм КР, що зливається за одну ферментацію (цикл):

$$V_{\text{кр}} = K_1 G_{\text{цк}} C_{\text{рп}}/P_{\text{кр}} \times (1-0,6) = 1,1 \times 9,6 \times 0,94/1,2 \times (1-0,6) = 20,68 \text{ м}^3$$

2.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу:

За виробничий цикл отримують $V_{\text{кр}} = 20,68 \text{ м}^3$ культуральної рідини.

При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її витрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10 %, також потрібно враховувати втрати які пов'язані з виділенням і очищення продукту, які становлять 25%.

Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становить:

$$V_{\text{роб1}} = V_{\text{кр}}/(1-E_{\text{ф}}) = 20\ 680/(1-0,35) = 31\ 815,38 \text{ л.},$$

де $E_{\text{ф}}$ - втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом 31 815,38 л. При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,5-0,6$ розраховують можливий геометричний об'єм ферментера ($V_{\text{ф}}$), що становить

$$V_{\text{ф}} = V_{\text{роб.1}}/K_{\text{зап}} = 31\ 815,38/0,6 = 53\ 025,6 \text{ л}$$

Приймаємо найближчій за об'ємом ферментер 60 м^3 та уточнюємо прийнятний раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап1}} = 31\ 815,38/60\ 000 = 0,53$$

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10 % від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{пс1} = V_{роб.1} / (1 + X_{ф}) = 31\,815,38 / (1 + 0,1) = 28\,923,07 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить $V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 31\,815,38 - 28\,923,07 = 2\,892,31 \text{ л}$

Для одержання 2 892,31 л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10 %.

Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{роб.2} = V_{пм1} / (1 - E_{па}) = 2\,892,31 / (1 - 0,10) = 3\,213,67 \text{ л}$$

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

$$V_{пс2} = V_{роб.2} / (1 + X_{па}) = 3\,213,67 / (1 + 0,1) = 2\,921,518 \text{ л}$$

Кількість інокуляту $V_{роб.2} = 3\,213,67 \text{ л}$ можна одержати під час культивування *E.coli* BL21 у посівному апараті геометричного об'єму $V_{па2} = V_{роб.2} / K_{зап} = 3\,213,67 / 0,6 = 5\,356,1 \text{ л}$. Приймаємо найближчій за об'ємом посівного апарату $V_{ф} = 6 \text{ м}^3$ і уточнюємо раніше вибраний коефіцієнт :

$$K_{з1} = V_{роб.2} / V_{ф} = 0,53$$

Кількість посівного матеріалу для посівному апараті буде становити:

$$V_{пм2} = V_{роб.2} - V_{пс2} = 3\,213,67 - 2\,921,518 = 292,15 \text{ л}$$

Для одержання 292,15 л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря , які становлять 10 %.

Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{роб.3} = V_{пм2} / (1 - E_{па}) = 292,15 / (1 - 0,10) = 324,6 \text{ л}$$

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

$$V_{пс3} = V_{роб3} / (1 + X_{па}) = 324,6 / (1 + 0,1) = 295,09 \text{ л}$$

Кількість інокуляту $V_{роб.3} = 324,6$ л можна одержати під час культивування *E.coli* BL21 у посівному апараті геометричного об'єму $V_{па3} = V_{роб.3} / K_{зап} = 324,6 / 0,6 = 541$ л. Приймаємо найближчій за об'ємом посівного апарату $V_{ф} = 600$ л і уточнюємо раніше вибраний коефіцієнт :

$$K_{з1} = V_{роб.3} / V_{ф} = 0,54$$

Кількість посівного матеріалу для посівному апараті буде становити :

$$V_{пм3} = V_{роб.3} - V_{пс3} = 324,6 - 295,09 = 29,51 \text{ л.}$$

Для одержання 29,51 л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря , які становлять 10 %.

Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{роб.4} = V_{пм3} / (1 - E_{па}) = 29,51 / (1 - 0,10) = 32,78 \text{ л}$$

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

$$V_{пс4} = V_{роб4} / (1 + X_{па}) = 32,78 / (1 + 0,1) = 29,8 \text{ л}$$

Кількість інокуляту $V_{роб.4} = 32,78$ л можна одержати під час культивування у посівному апараті геометричного об'єму:

$$V_{па4} = V_{роб.4} / K_{зап} = 32,78 / 0,6 = 54,63 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчій за об'ємом посівного апарату $V_{ф} = 60$ л і уточнюємо раніше вибраний коефіцієнт :

$$K_{з1} = V_{роб.3} / V_{ф} = 0,54$$

Кількість посівного матеріалу для посівному апараті буде становити:

$$V_{пм4} = V_{роб.4} - V_{пс4} = 32,78 - 29,8 = 2,98 \approx 3 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту для засіву малого інокулятора $V_{\text{пм5}}=3$ л можна його отримати на колбах на качалці. Для цього використовуються качалочні колби об'ємом $V_{\text{колб}}=750$ мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}}=0,2$.

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме:

$$N_{\text{колб}}=V_{\text{пм2}}/(V_{\text{колб}} \times 0,2)=3\ 000/(750 \times 0,2)= 20 \text{ колб.}$$

Для одержання посівного матеріалу необхідно 20 качалочні колби.

Розділ 3. Обґрунтування вибору технологічної схеми

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

Ароматичні речовини широко використовуються в харчовій, фармацевтичній та косметичній промисловості. На сьогодні більшість ароматизаторів отримують екстракцією з рослинної сировини або хімічним синтезом. Дані способи мають суттєві недоліки: низький вміст цільового продукту в рослинах і велика кількість супутніх домішок, а також негативний вплив на екологію при хімічному синтезі. Даних негативних факторів позбавлений біотехнологічний шлях отримання ароматизаторів, який набуває поширення. Більше того, законодавство США та Європи надає перевагу ароматизаторам біотехнологічного походження надаючи їм статус *V-natural*[59].

Один з нових і перспективних напрямків в сучасній біотехнології є отримання лімонену. Лімонен – це найбільш розповсюджений терпен в природі і один з найпоширеніших терпенів у галузі смаку та аромату. Він є головним компонентом деяких цитрусових олій, які отримують з апельсину, лимону, лайму і грейфруту. Його застосовують як ароматичну добавку в харчовій, парфумерній та фармацевтичній промисловості, також є інші сфери його застосування. Було проведено ряд досліджень із біотехнологічного отримання лімомену, у якості продуцентів використовували такі мікроорганізми як: *Synechococc sp.*, і *Escherichia coli* та дріжджі *Yarrowia lipolytica* [13,14,15,16].

					НУХТ БТЕК 02. 02. 01 КП ПЗ			
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата				
Розробник		Івасенко М.О.			Розділ 3. Обґрунтування вибору технологічної схеми	Літера	Аркуш	Аркушів
Керівник		Воронцов О.О.						
Н. контр								
Консульт								
Зав. Каф.		Пирог Т. П.						
						Кафедра БТМ		

Особливості синтезу лімонену штамами *Synechococc sp.* PCC 7002, *Yarrowia lipolytica*, *Escherichia coli* BL21

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Тривалість культивування, год	Концентрація лімонену, г/л.	Особливості процесу	Використана література
1	2	3	4	5	6
<i>Synechococc sp.</i> PCC 7002	Na ₂ EDTA-0,03 NaCl-18 MgSO ₄ – 5 KCl-5 CaCl ₂ ×2H ₂ O-0,37 NaNO ₃ - 1 KH ₂ PO ₄ – 0,050 Tris hydrochloride – 0,00825 Вітамін B12 – 0.000004 FeCl ₃ ×6H ₂ O – 0,0038 H ₃ BO ₃ – 0,034 MnCl ₂ ×4H ₂ O – 0,0043 ZnCl ₂ – 0,000315 MoO ₂ – 0,00003 CuSO ₄ ×5H ₂ O – 0,000003 CoCl ₂ ×6H ₂ O – 0,0000122 Na ₂ S ₂ O ₃ – 3	48	0,004	t-37 °C, при 250 мікромоль фотонів, 1% CO ₂ , протягом 48 годин.	Davies F., Work V., Beliaev A., Posewitz M. Engineering limonene and bisabolene production in wild type and glycogen-deficient mutant of <i>Synechococcus sp.</i> PCC 7002// Department of Chemistry and Geochemistry, Colorado School of Mines, Golden, CO, USA. Volume 21. Article 21. June 2014.

1	2	3	4	5	6
<i>Yarrowia lipolytica</i> Po1f-LN-05	Середовище YPD – 50 мл, Піровиноградна кислота – 4 Додекана – 1 мл.	72	0,023	t- 30 °С, перемішування – 220 об/хв, протягом 72 годин	Cao X., Lv Y.-B., Chen J., Imanaka T., We, L.-J., Hua Q. Metabolic engineering of oleaginous yeast <i>Yarrowia lipolytica</i> for limonene overproduction// <i>Biotechnology for Biofuels</i> , 9,2016, 214.
<i>Escherichia coli</i> BL21	Середовище M9 (Na ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O-75.2, KH ₂ PO ₄ - 30,NaCl-5 , NH ₄ Cl- 5, 20% розчин глюкози, MgSO ₄ ×7H ₂ O- 0.246, CaCl ₂ - 0.147, ampicilin – 150 мкг/мл, chloramphenicol– 30 мкг/л, Biotin – 0,001 мг/л, Thiamin – 0,001 мг/л, EDTA- 5, FeCl ₃ ×6H ₂ O-0,83, ZnCl ₂ -84 мг/л, CuCl×2H ₂ O-13 мг/л, CoCl ₂ ×2H ₂ O-10 мг/л, H ₃ BO ₃ -10 мг/л, MnCl ₂ ×4H ₂ O-1,6 мг/л) Гліцерин – 23 мл/л MgSO ₄ – 0,6 Діізонілфталат – 0,5 л Ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозид – 0,001 мг/л US* мікроелементи – 1 мл (HCl – 36,46, MnCl ₂ ×4H ₂ O – 1,5, ZnSO ₄ – 1,05,	45	2,7	Культивування проводять з підживленням після 20 години кожні 5 годин культивування по 124,24 л гліцерину, початково вводять -1,5 мл/л гліцерину, t – 30 °С, рН – 7,2, обороти мішалки – 250 об/хв, аерація – 1 об/об×хв.	Christian Willrodt, Christian David, Sjeff Cornelissen, Bruno Bühler, Mattijs K. Julsing and Andreas Schmid. Engineering the productivity of recombinant <i>Escherichia coli</i> for limonene formation from glycerol in minimal media// <i>Biotechnol J.</i> 2014 Aug;9(8):1000- 12.

Закінчення таблиці 3.1

<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
	H ₃ BO ₃ – 0,30 , Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O – 0,25, CuCl ₂ × 2H ₂ O – 0,15, Na ₂ EDTA×2H ₂ O – 0,84, FeSO ₄ ×7H ₂ O – 4,87, CaCl ₂ ×2H ₂ O – 4,12)				

Згідно з даними, наведеними в таблиці 2.1., можна зробити висновок, що найбільш оптимальним для біосинтезу лімонену є штам *E. coli* BL21. Оскільки з наведеною інформації випливає, що даний продуцент синтезує максимальну кількість лімонену протягом найменшої кількості часу, при цьому ферментацію з здійснюють з підживленням гліцерином для досягнення максимального виходу цільового продукту протягом всього етапу ферментації.

Характеристика штаму

Штам *Escherichia coli* BL21 є генно-модифікованим штамом, який був сконструйований за допомогою перенесення кодон-оптимізованими генами лімоненсинтази (LS) від *Mentha spicata* та геранілпірофосфат GPP синтази 2 (AGPPS2) від *Abies grandis*. Для цього було сконструйовано вектори експресії pBAD:LS і pET24:AGPPS2. Ці дві системи були обрані, оскільки раніше повідомлялось, що їх використання призводило до функціональної експресії синтезу геранілпірофосфату (GPP) та синтезу в *E.coli*.

Безмембрані екстракти готували з індукованих клітин *E. coli* BL21 які містили або pBAD: LS / pET24: AGPPS2, або pBAD: LS / pET24: KO. З геранілпірофосфатом (GPP) як субстратом спостерігалась активність 1,6 та 3,6 мкг білка. При використанні ізопентенил-пірофосфату (IPP) та диметилаліл-пірофосфату (DMAPP), активність в двухстадійній біоконверсії складала 0,13-0,15 мкг білка.

Оптимізація синтезу лімонену у *E.coli*.

Першою стратегією оптимізації біосинтезу було підвищення доступності попередників, зазначалось, що така стратегія була успішною для виробництва сесквітерпена аморфа-4,11-дієна в *E. coli*, а зовсім недавно також застосовувалася до виробництва лімонену. Для підвищення внутрішньоклітинної доступності попередників ізопентенил-пірофосфат (IPP) та димети-лаліл-пірофосфат (DMAPP) було введено ортологічний шлях мевалонату (MVA) від *Saccharomyces cerevisiae*. Всі гени мевалонного шляху,

які перетворюють ендogenous ацетил-CoA в ізопентенил-пірофосфат (IPP) та диметилаліл-пірофосфат (DMAPP), були зібрані в плазміді pMVAidi. Друга плазміда pTAC:LS:AGPPS2 містила гени LS та AGPPS2. Три штами *E. coli* (DH5 α , JM101 та MG1655) та штам *E. coli* BL21 (DE3) в які були вбудовані плазміді pMVAidi та pTAC: LS: AGPPS2 після чого їх культивували у присутності діізоніл фталату (DNIP). Таким чином було досягнуто збільшення виходу лімонену у 60 разі порівняно з початково сконструйованими штамми. Цей результат підтверджував, що постачання ендogenous попередника є обмежуючим фактором для синтезу лімонену.

Вплив ацетату на синтез лімонену

У штаммах *E. coli* спостерігалась різна кінетика утворення лімонену, виявилось, що концентрація ацетату корелює з рівнем утворення лімонену. Так штам *E. coli* DH5 α синтезував найбільшу кількість ацетату (5,25 г/л) і одночасно синтезував найвищу концентрацію лімонену через 30 год ($19,53 \pm 0,75$ мг/л). *E. coli* JM101 синтезував низькі кількості ацетату (3,22 г/л), і дав найнижчу концентрацію лімонену через 30 год ($10,88 \pm 0,43$ мг/л). Концентрації біомаси $1,69$ Г_{густина щільності заряду}/л для *E. coli* JM101 та $1,54$ Г_{густина щільності заряду}/л для *E. coli* DH5 α були подібними для обох штамів, але швидкість поглинання глюкози під час логарифмічного росту була найбільшою для *E. coli* JM101 ($\sim 2,4$ ммоль Г_{густина щільності заряду}/год). Для того, щоб перевірити, чи впливало утворення ацетату на утворення лімонену, було досліджено штам *E. coli*, у якого не було гену фосфотрансацетилази (pta), який перетворює ацетил-CoA в ацетилфосфат. *E. coli* MG1655 DE3 (Δpta , $\Delta ldhA$, $\Delta adhE$) (pMVAidi, pTAC: LS: AGPPS2) продукував менше лімонену ($9,07 \pm 0,34$ г/л) і менше ацетату (0,85 г/л), ніж штамми з функціональним геном pta в тих же експериментальних умовах. Відсутність функціонального гена pta та отримані внаслідок цього фізіологічні властивості клітини перешкоджали збільшенню потоку метаболітів у напрямку вироблення лімонену. Таким чином, *E. coli* BL21 (DE3) було обрано як кращий штам, оскільки він показав швидкий ріст,

високу продуктивність лімонену ($15,2 \pm 2,4$ мг/л за 30 год) та низьке утворення ацетату, що, як правило, вважається згубним для росту та експресії генів.

З метою досягнення максимальної концентрації лімонену на дешевому джерелі вуглецю *E.coli* BL21 (DE3) (pMVAidi, pTAC: LS: AGPPS2) культивували в ферментері об'ємом 3,1 л з подачею в партії з глюкозою або гліцерином як джерелом вуглецю та DINP як органічним розчинником-носієм (співвідношення фаз 1: 2). З гліцерином як єдиним джерелом вуглецю була досягнута кінцева концентрація лімонену 2,7 г/л протягом 45 год, що в 3,9 рази вище, ніж кінцева концентрація лімонену, досягнута з використанням глюкози як джерело вуглецю (0,69 г/л). Крім того, було досягнуто 26% вищої кінцевої концентрації біомаси 61,8 Г_{густини щільності заряду}/л з гліцерином, ніж з глюкозою (49,1 Г_{густини щільності заряду}/л). Це пояснюється невстановленою метаболічною інактивацією клітин при культивуванні на глюкозі (накопичення глюкози). При культивуванні на гліцерині такого ефекту не спостерігалось і утворення лімонену було постійним протягом всього періоду ферментації. Біосинтез проводили на гліцерині в реакторі 3,1 літри з підживленням. Отриманий вихід при цьому сягав 2,7 г/л[16].

Клітини штаму *E.coli* BL21 не утворюють спор, паличкоподібної форми, завдовжки 1-2 мкм і 0,1-0,5 мкм в діаметрі. Штам росте в аеробних умовах. Оптимальна температура росту 20-30 °С і нейтральним значенням рН. Оптимальне середовище для росту — середовище Лурія-Бертані.

Вартість компонентів поживного середовища

Продуцент	Компоненти поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
1	2	3	4	5
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	Na ₂ EDTA – 0,03	5130	17,1	[1]
	NaCl – 18	5	0,27	[2]
	MgSO ₄ – 5	20	4	[2]
	KCl – 5	50	10	[2]
	CaCl ₂ ×2H ₂ O – 0,37	25	9,25	[2]
	NaNO ₃ – 1	250	2,5	[2]
	KH ₂ PO ₄ – 0,050	40	2	[2]
	Tris hydrochloride – 0,00825	5697	47	[3]
	Вітамін B12 – 0,000004	2016	0,008	[3]
	FeCl ₃ ×6H ₂ O – 0,0038	48	0,18	[3]
	H ₃ BO ₃ – 0,034	36	1,22	[3]
	MnCl ₂ ×4H ₂ O – 0,0043	48	0,2	[3]
	ZnCl ₂ – 0,000315	88	0,03	[2]
	MoO ₂ – 0,00003	588	0,017	[3]
	CuSO ₄ ×5H ₂ O – 0,000003	90	0,0003	[3]
	CoCl ₂ ×6H ₂ O – 0,0000122	240	0,003	[3]
Na ₂ S ₂ O ₃ – 3	1200	36	[3]	
Вартість 1 л середовища – 130				
<i>Yarrowia lipolytica</i> Po1f-LN-051	Середовище YPD – 50 мл	0,63		[4]
	Дріжджовий екстракт – 20	120	6	[3]
	Пептон – 20	48	2,4	[3]
	Глюкоза – 20	80	4	[2]
	Піровиноградна кислота – 4	250	62,5	[3]
	Додекана – 1 мл	25	0.025	[3]

1	2	3	4	5
	Вартість 1 л середовища - 63,15			
<i>E. coli</i> BL21	Середовище М9 – 0,3 літр	28,3		
	Na ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O-75.2	10	0,13	[3]
	KH ₂ PO ₄ - 30	34	1,3	[3]
	NaCl-5	5	1	[2]
	NH ₄ Cl- 5	6	1,2	[3]
	20% розчин глюкози (40)	18	0,45	[2]
	MgSO ₄ ×7H ₂ O- 0.246	20	4,9	[2]
	CaCl ₂ - 0.147	25	3,67	[2]
	Biotin – 0,001 мг/л	4800	4,8	[2]
	Thiamin – 0,001 мг/л	768	0,77	[2]
	EDTA – 5	78	15,6	[2]
	FeCl ₃ ×6H ₂ O-0,83	48	4	[3]
	Гліцерин – 23 мл/л	46	1,9	[2]
	MgSO ₄ – 0,6	20	0,12	[2]
	Діізононілфталат – 0,5 л	62	31	[3]
	Ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозид – 0,2383	25,6	6,01	[3]
	US* мікроелементи – 1 мл	0,95		
	HCl – 36,46	36	1.01	[3]
	MnCl ₂ ×4H ₂ O – 1,5	36	24	[3]
	ZnSO ₄ – 1,05	24	20	[2]
	H ₃ BO ₃ – 0,30	36	10,8	[2]
	Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O – 0,25	48	12	[3]
	CuCl ₂ × 2H ₂ O – 0,15	116	17,4	[3]
Na ₂ EDTA×2H ₂ O –0,84	4941	4,29	[1]	
FeSO ₄ ×7H ₂ O – 4,87	2,5	0,5	[3]	
CaCl ₂ ×2H ₂ O –4,12	19	4,6	[2]	
	Вартість 1 л середовища – 68,28			

Примітка. Ціни наведено на 25 грудня 2019 року : 1-
<https://www.sigmaaldrich.com;> 2-<https://prom.ua;> 3-<https://russian.alibaba.com;> 4-
<https://www.sigmaaldrich.com;>

Згідно з даними, наведеними в таблицях 2.1, 2.2, можна зробити висновок, що штам *E.coli* BL21 найбільш оптимальним для синтезу лімонену. Його культивування здійснюють на недорогому поживному середовищі, при цьому концентрація лімонену найбільша.

Умовна вартість 1 г лімонену при культивуванні *Synechococc sp.* PCC 7002, *Y. lipolytica*, *E. coli* BL21.

Таблиця 3.3

Продуцент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація лімонену, г/л	Умовна вартість 1 г лімонену, грн	Тривалість культивування, год	Концентрація лімонену синтезованого за год, г/л
<i>Synechococc sp.</i> PCC 7002	130	4 мг/л	35 000	48	0,083333 (мг)
<i>Y. lipolytica</i> Po1f-LN-051,	63,15	23,56 мг/л	2 680,4	72	0,327 (мг)
<i>E. coli</i> BL21	68,28	2,7 г/л	25,6	45	0,06

З даних наведених у *таблиці 4.3* видно, що найменшу вартість 1 г продукту має лімонен, який отриманий за допомогою штаму *E.coli* BL21. Цей штам характеризується високим виходом цільового продукту (2,7 г/л) і відносно простим і дешевим поживним середовищем.

3.2. Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера.

Згідно з наведеної інформації для отримання лімонену штам *E.coli* BL21 культивують в мезофільних умовах, глибинним способом, при рН-7, культивування проводять із внесення гліцерину на 20 годині культивування.

Глибинний спосіб культивування має ряд очевидних переваг перед поверхневим. Такі як можливість скоротити виробничі площі, виключити ручну працю, спростити механізацію та автоматизацію виробництва. А оскільки штам аеробний мезофіл, це збільшує ризики контамінації при поверхневому чи твердофазному культивуванні. Тому, саме при глибинному культивуванні у ферментері можна створити асептичні умови для культивування даного продуцента[58].

Для отримання лімонену доцільно використовувати періодичне культивування з підживленням, оскільки максимальна кількість лімонену накопичується в стаціонарній фазі росту. Періодичне культивування це замкнена система, в яку одноразово вводиться додатково субстрат та не відводяться метаболіти. Тобто культура росте доти, поки вміст якого-небудь необхідного компоненту не стане мінімальним, або взагалі не вичерпається, після чого культура припиняє свою життєдіяльність.

Обґрунтування типу ферментера

Для культивування *E.coli* BL21 необхідна достатня аерація середовища, оскільки бактерії є облігатними аеробами. У зв'язку з цим, для вирощування обирають ферментер, який оснащений барботером і механічним піногасником.

Для забезпечення диспергування кисню в усьому об'ємі середовища та для інтенсифікації масообміну ферментер треба оснастити ферментер мішалкою. Оскільки під час росту відбувається накопичення біомаси, яка підвищує в'язкість середовища, тому процес вимагає інтенсивної аерації. Через це ферментер слід оснастити лопатевою мішалкою із частотою обертів 250 об/хв, яка підходить для перемішування культуральної рідини середньої густини, при цьому аерація через барботер становить 1 об/об ×хв [16].



Ферментер компанії Ruian Global Machinery Co., Ltd. виготовляє ферментер потрібного об'єму з нержавіючої сталі, який можна обладнати на вимогу замовника.

Примітка*:

<https://ruianglobal.en.made-in-china.com/product/IXPQdCKxZYpS/China-High-Efficiency-Automatic-Yeast-Bacteria-Biological-Germs-Beer-Wine-Fermentation-Tank-Fermenter.html>

Особливості підготовки і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту і виробничого біосинтезу

Стерилізація компонентів поживного середовища залежить від їх фізико-хімічних властивостей. Попередньо компоненти середовища ділять на певні композиції, склад яких залежить від умов стерилізації.

Оскільки в середовищі культивування міститься гліцерин, ізопропіл- β -D-1-тіогалактопіранозид, середовище M9 які є термолабільними речовинами, які втрачають свої властивості при високих температур, то для стерилізації цих компонентів потрібні більш м'які режими стерилізації.

Таблиця 3.4

Склад поживного середовища:

Продуцент	Склад поживного середовища
<i>Escherichia coli</i> BL21	Середовище M9 -0,3 л Гліцерин – 23 мл/л MgSO ₄ – 0,6 г/л Діізонанілфталат – 0,5 л Ізопропіл- β -D-1-тіогалактопіранозид – 0,2383 г/л US* мікроелементи – 1 мл

3.2.1. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

Склад поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках:

Таблиця 3.5

Склад поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках

Продуцент	Склад поживного середовища
<i>Escherichia coli</i> BL21	Середовище M9 – 50 мл Гліцерин – 0,5 мл/л MgSO ₄ – 0.242 г/л Ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозид – 0,2383 г/л US* мікроелементи – 1 мл

На цьому етапі використовується качалочні колби об'ємом 750 мл, які заповнюються 150 мл поживного середовища.

Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *E.coli* BL21, умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: Середовище M9, 0,5 мл/л гліцерину, ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозид.

Композиція Б: MgSO₄, US* мікроелементи.

Компоненти композиції А об'єднують, оскільки вони є термолабільними і потребують м'якого режиму стерилізації. Солі композиції Б стерилізують окремо, тому що для солей застосовують більш жорсткий режим стерилізації. Після змішування композицій проводиться мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти.

Склад поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторах:

Продуцент	Склад поживного середовища
<i>Escherichia coli</i> BL21	Середовище М9 – 0,3 л Гліцерин – 1,5 мл/л MgSO ₄ – 0,6 г/л Ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозид – 0,2383 г/л US* мікроелементи – 1 мл

3.2.2. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 60 літрів.

Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *E.coli* BL21, умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: Середовище М9, ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозид.

Композиція Б: MgSO₄, US* мікроелементи.

Композиція В. 1,5 мл гліцерину

Компоненти композиції А об'єднують, оскільки вони є термолабільними і потребують м'якого режиму стерилізації, композиція А стерилізуються в інокуляторі. Солі композиції Б стерилізують окремо, тому що для солей застосовують більш жорсткий режим стерилізації, композиція Б стерилізується в стерилізаторі при режимі перемішування 75 об/хв. Композиція В не стерилізується, а через об'ємно ваговий дозатор подається у гребінку інокулятор. Після змішування композицій проводиться мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти.

3.2.3. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 600 літрів.

Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *E.coli* BL21, умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: Середовище М9, ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозид.

Композиція Б: MgSO₄, US* мікроелементи.

Композиція В. 1,5 мл гліцерину

Компоненти композиції А об'єднують, оскільки вони є термолабільними і потребують м'якого режиму стерилізації, композиція А стерилізуються в інокуляторі. Солі композиції Б стерилізують окремо, тому що для солей застосовують більш жорсткий режим стерилізації, композиція Б стерилізується в стерилізаторі змішувачі при режимі перемішування 75 об/хв. Композиція В не стерилізується, а через об'ємно ваговий дозатор подається у гребінку інокулятор. Після змішування композицій проводиться мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти.

3.2.4. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 6 м³.

Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *E. coli* BL21, умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: Середовище М9, ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозид.

Композиція Б: MgSO₄, US* мікроелементи.

Композиція В. 1,5 мл гліцерину

Компоненти композиції А об'єднують, оскільки вони є термолабільними і потребують м'якого режиму стерилізації, композиція А стерилізуються в інокуляторі. Солі композиції Б стерилізують окремо, тому що для солей застосовують більш жорсткий режим стерилізації, композиція Б стерилізується в стерилізаторі при режимі перемішування 75 об/хв. Композиція В не стерилізується а через об'ємно ваговий дозатор подається у гребінку інокулятор. Після змішування композицій проводиться мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти.

3.2.5. Виробничий біосинтез в ферментері об'ємом 60 м³.

Таблиця 3.7

Склад поживного середовища для виробничого біосинтезу:

Продуцент	Склад поживного середовища
<i>Escherichia coli</i> BL21	Середовище М9 – 0,3 л Гліцерин – 23 мл/л MgSO ₄ – 0,6 г/л Діізононілфталат – 0,5 л Ізопропіл-β-D-1-тіоґалактопіранозид – 0,2383 г/л US* мікроелементи – 1 мл

Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *E. coli* BL21, умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: Середовище М9, ізопропіл-β-D-1-тіоґалактопіранозид, MgSO₄, Діізононілфталат, US* мікроелементи.

Композиція Б: 23 мл/л гліцерину.

Компоненти композиції А об'єднують і стерилізують за допомогою УБС-30. Композиція Б не стерилізується, а через об'ємно ваговий дозатор подається у гребінку ферментера. Після змішування композицій проводиться мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти.

3.3. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту.

Лімонен – це ароматична речовина, яка випускається у вигляді сухого порошку.

Згідно з патентом виділення і очистка лімонену включає такі стадії:

1. Відділення культуральної рідини від біомаси і отримання супернатанту;
2. Отриману супернатант заморожують (-80°C, 1 годину);
3. Після відтаювання центрифугують (4700 об/хв, 20 хвилин);
4. Органічної фази переганяли при зниженому тиску (4-6 мбар, 160 ° C).

Як альтернативний метод можна використовувати такий метод виділення:

3.3.1. Відділення культуральної рідини від біомаси.

Оскільки лімонен - це екзометаболіт, для його очищення потрібно відділити біомасу від культуральної рідини. З цією метою можна застосувати наступні методи :

- Фільтрування;
- Центрифугування;
- Сепарування;
- Флотація

Фільтрація - це процес проходження розчину чи суспензії через пористу перегородку (мембрану) за різницею тиску з обох боків мембрани, при чому розмір профільтрованих частинок обмежується діаметром пор.

Фільтрування процес менш енергоємний, проте одночасно і менш ефективний, порівняно з сепарацією. Оскільки в поживному середовищі для культивування лімонену наявні такі в'язкі компоненти як гліцерин то використання фільтрування як способу відділення біомаси від культуральної рідини являється неможливим, оскільки гліцерин в'язка речовина яка може забити пори мембрани, що в свою чергу унеможливить проходження культуральної рідини крізь них[60].

Сепарування - це процес розділення змішаних об'ємів сумішей різної густини, емульсій, суспензій твердих частинок або краплинок в газі. Даний процес використовується у процесі одержання хлібопекарських дріжджів і кормових дріжджів, ферментів, антибіотиків, а також багатьох інших продуктів хіміко-фармацевтичної, медичної і харчової промисловості. Сепарація можлива, якщо розчин має відмінності в характеристиках компонентів в суміші. Сепарування має такі переваги перед фільтруванням та іншими методами:

-Немає потреби в застосуванні фільтрувальних елементів, що дає можливість непотрібну для подальшої переробки фракцію використовувати як кормову добавку;

- Матеріал обробляється з найменшими витратами активної речовини;
- Процес легше піддається автоматизації, агрегати займають менше місця, легше мити устаткування[61].

Оскільки під час культивування використовується велика кількість поживного середовища (близько 31 815,38 літрів) то використання сепаратора для розділення твердої та рідкої фракції буде недоцільним через великі енергозатрати та недоцільність його використання. Також недоліком сепарування є громіздке обладнання і складність в обслуговуванні, а також істотним недоліком сепараторів є швидке забруднення мундштуків і між тарілчастого простору механічними включеннями й мертвими клітинами[60].

Флотація – це спосіб розділення сумішей твердих дрібних частинок, що належать різним речовинам, а також виділення крапель дисперсної фази з емульсій, заснований на їх різній змочуваності і здатності накопичувати на поверхні розділу фаз. Даний метод використовують у виробництві білка деяких одноклітинних мікроорганізмів, та у пивоварінні.

Переваги методу флотації: Економічність, висока продуктивність і можливість використання в безперервних процесах.

Недоліками методу флотації: Флотація не дає гарантій повного відділення біомаси від культуральної рідини, тому застосування даного методу є недоцільним.

Центрифугування: Центрифугування – це примусове осадження часток за рахунок збільшення швидкості відцентрових сил. У технологіях мікробного синтезу використовують різні типи центрифуг: осаджувальні, шнекові, безперервної дії, тощо. Центрифугування дає змогу виділяти з культуральних рідин біомасу бактерій, дріжджів, міцеліальних грибів[60].

Висновок: Проаналізувавши наведені вище дані можна зробити висновок, що найбільш доцільним буде використання центрифугування як методу відділення рідкої фази від твердої і отримання супернатанту для подальшої очистки. Перевагою центрифугування є те, що центрифуга розвиває більшу

швидкість ніж сепаратор, що в свою чергу забезпечує краще розділення рідкої і твердої фази.

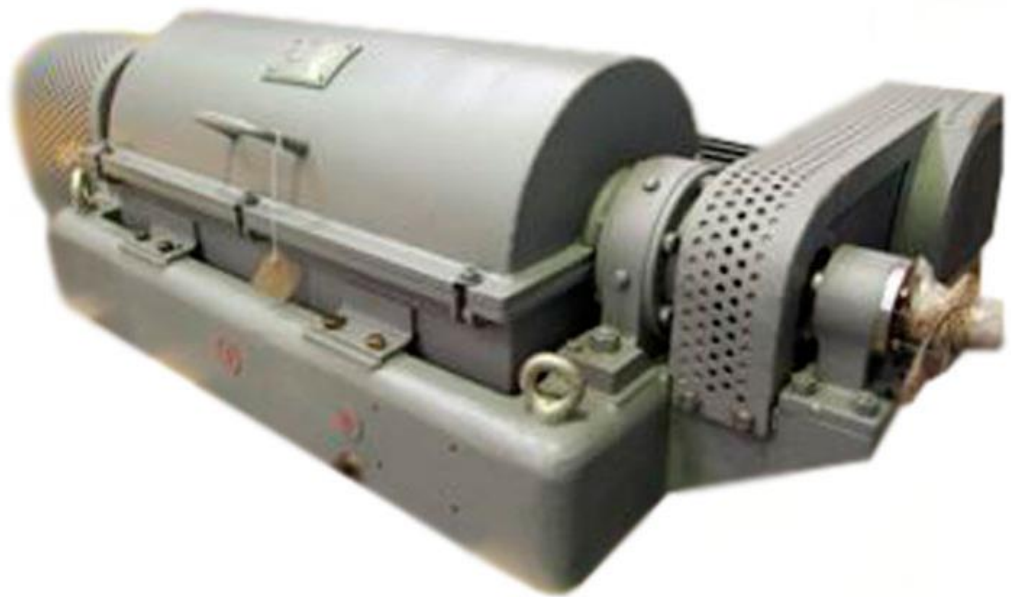


Рис 3.1. Центрифуга ОГШ-202К-05

Для центрифугування доцільно використати систему центрифугування ОГШ-501. Дана система проста в конструкції, може забезпечувати безперебійність технологічного процесу, потребує мінімального обслуговування.

3.3.2. Очищення супернатанту, після центрифугування, від високомолекулярних сполук.

Для виділення лімонену можна використовувати наступні методи:

-Заморожування;

- Осадження;
- Ультрафільтрація;
- Флотація.

Заморожування:

Для заморожування в даний час в промисловому масштабі використовуються наступні кріогенні агенти: рідкий азот, діоксид вуглецю і хладон. Основними перевагами кріогенного методу є: невелика тривалість процесу, збереження якості продукту, мінімальні втрати його маси за рахунок усушки без застосування спеціальних пакувальних матеріалів. Найбільшого поширення для заморожування набув рідкий азот, що володіє відносною інертністю, низькою температурою і високими термодинамічними властивостями. Заморожування рідким азотом в даний час здійснюється шляхом занурення і зрошення.

Для заморожування до значення температури -80 замість азоту використовують діоксид вуглецю. При газовому середовищі температурний діапазон підтримується в режимі від -20 ° С до -70 ° С, при охолодженні «снігом» і гранулами - $78,9$ ° С. Теплота сублімації твердого CO_2 становить 575 кДж/кг, тоді як теплота пароутворення рідкого азоту - $199,71$ кДж/кг. Використання перепаду температур між продуктом і холодоагентом, а також відведення тепла при сублімації твердого CO_2 , дозволяє отримувати високі швидкості заморожування без деформацій структури продукту. При цьому продукти, що заморожуються за допомогою CO_2 , мають високу органолептичну оцінку, а втрати маси за рахунок усушки складають $0,3\%$. Діоксид вуглецю можна застосовувати для контактного заморожування практично будь-яких штучних харчових продуктів. При цьому CO_2 має бактерицидні властивості: є ефективним засобом для пригнічення розмноження анаеробних, а також аеробних бактерій на поверхні продукту і зниження окислювальних процесів.

В даний час у світовій практиці спостерігається тенденція до збільшення виробництва діоксиду вуглецю, причому його частка в харчовій

промисловості також зростає. Існують різні комерційні види діоксиду вуглецю. Заводи-виробники випускають рідкий CO₂, що зберігається в танках, сховищах, балонах. При дроселюванні рідкого CO₂, утворюється в різних кількостях, в залежності від температури зберігання, у вигляді кристаликів льоду і газоподібний CO₂. Випускають твердий CO₂, (сухий лід) у вигляді спресованих великих блоків, дрібно фасованою гранульований лід у вигляді таблеток, паличок або кульок, використовуючи для цього рідкий низькотемпературний CO₂. Для виробництва дрібнофасованою сухого льоду використовують гранулятори, розроблені фірмами США, Японії. Гранулятори представляють собою машини поршневого типу з ротаційним елементом, що виробляють гранули циліндричної форми, довжиною від 6 до 36 мм і діаметром 9,0; 10; 16; 19 мм [62].

Недоліки: Недоліком методу заморожування являється те, що цей метод являється лабораторним і не може використовуватись в промисловому масштабі.

Осадження:

Осадження емульсії базується на зміні їх розчинності з додаванням певних речовин. Супернатант в своєму складі містять крім лімонену містить велику кількість сполук і речовин колоїдної природи. Виділення лімонену з такої складної суміші складає великі труднощі, так як система дуже чутлива до зовнішніх дій, і тому забезпечення високого виходу лімонену в осад вимагає суворого дотримання умов, при яких починається агрегування білкових молекул і випадання їх в осад[60].

Недоліки: Основними недоліками цього методу є недостатня вибірковість осадження.

Ультрафільтрація

Головним елементом ультрафільтраційної мембрани є полімерна плівка. Ця плівка може бути суцільною, вона обмежено набрякає у воді, даний процес забезпечує збереження термолабільних сполук, дозволяє звільнитися від баластних речовин.

Ультрафільтрацію потрібно проводити в циркуляційних апаратах періодичної дії.

Через таку плівку речовини проходять тільки завдяки дифузії. Сьогодні для ультрафільтрування і зворотного осмосу використовують мікропористі анізотропні та ізотропні мембрани.

Недоліки: Невеликі за розміром пори фільтрів можуть забиватися, що призводить до зниження продуктивності, тому існує необхідність періодичної промивки матеріалу мембрани. Для запобігання утворення забивання пор мембрани осадами передбачено використовувати циркуляційний насос, що забезпечує лінійну швидкість потоку рідини через мембрану близько 2-5 м/с. Для зниження опору який утвориться в процесі фільтрації доцільно використовувати мембрани таких конструкцій: трубчасті мембрани і проточні плоскі мембрани[60].

Флотація

Це спосіб розділення сумішей твердих дрібних частинок, що належать різним речовинам, а також виділення крапель дисперсної фази з емульсій, заснований на їх різній змочуваності і здатності накопичувати на поверхні розділу фаз. Даний метод використовують у виробництві білка деяких одноклітинних мікроорганізмів, та у пивоварінні[60].

Переваги методу флотації:

Економічність, висока продуктивність і можливість використання в безперервних процесах.

Недоліки: Флотація не дає гарантій повного відділення біомаси від рідини в якій знаходиться лімонен, тому застосування даного методу є недоцільним.

Висновок: Для розділення супернатанту доцільно використовувати метод ультрафільтрації і пропуск через мембрану пермеату з цільовим продуктом. Оскільки культуральну рідину вже попередньо обробили використовуючи надцетрифугу можна прийняти, що твердих частинок які могли б забити пори мембрани немає.



Рис 3.2. Ультрафільтраційна установка Bucher Ultrastar XL

Для розділення супернатанту доцільно використовувати ультрафільтраційну установку Bucher Ultrastar XL. Дана установка призначення для фільтрування рідин великих об'ємів, повністю автоматизована, має високу надійність.

3.3.3. Концентрування отриманого пермеату.

Згідно із статтею для концентрування використовували метод дистиляції, як альтернативу можна використовувати:

- Вакуум-випарний установка з виносної поверхнею нагріву;
- Апарати системи Кестнера;
- Трубчастий вакуум-випарний;
- Роторний вакуум-випарний апарат.

Вакуум-випарна установка з виносною поверхнею нагріву складається з підігрівача, випарника, вакуум-насосу і циркуляційний насос відцентрового типу.

Для випарювання термочутливих рідин сконструйовано два типи випарних апаратів: горизонтальний – плівкового типу, з мішалкою всередині і вертикальний – з виносною поверхнею нагріву.

Розрідження в вакуум-випарній установці з виносною поверхнею нагріву створюється за рахунок вакуум-насосом, при цьому температура випарювання 35 °С, при вакуумі 720 мм. рт. ст. У горизонтальному випарнику випарювання рідини відбувається в плівці, створюваної за рахунок обертового ротора. В горизонтальному плівковому випарному апараті системи Яр'яна випарювальна рідина знаходиться всередині трубок, які об'єднанні в групи по три або п'ять трубок в кожній, що забезпечує рух рідини в середині рідини в прямому і зворотному напрямку. Гріючий пар або гаряча вода поступає в міжтрубний простір. З трубок суміш концентрованої рідини і вторинної пари надходять в сепараційні камери. У апаратах такого типу можна випаровувати рідини які піняться.

Проте апарати такого типу не можна вважати достатньо ефективними, так як регулярна подача в велике число горизонтальних трубок однієї і тієї ж кількості рідини представляє значні труднощі. Крім того пар, що конденсується на зовнішній поверхні трубок, стікає у вигляді рідини з однієї трубки на іншу, що призводить до того, що на нижніх рядах трубок накопичується рідина і ефективність їх дії в порівнянні з верхніми рядами зменшується[60].

Апарат системи Кестнера

В даному апараті випарювання відбувається в плівці рідини, що підіймається. Він складається з довгих трубок, укріплених в нижній та верхній решітках корпусу. Рідина подається в апарат нагрітою до температури, близької до температури кипіння. При надходженні рідини в сам апарат рідина закипає внаслідок передачі їй тепла від нагрівальних трубок. Утворені при цьому пари рухаються вгору по трубках до сепаратора і захоплюють з собою рідину у вигляді плівки, що рухається по внутрішній поверхні трубок. Пари рухаються з більшою швидкістю ніж рідина. В апаратах такої конструкції

можливо здійснювати рух рідини по трубах зі швидкістю 30-60 м/сек. Якщо при цьому паровий пристрій в гріючій камері має невеликий поперечний переріз, що забезпечує високу швидкість пари в цій камері, то це дозволяє досягти більш інтенсивної теплопередачі при короткочасному контакті з теплоносієм[60].

До недоліків даного типу апаратів можна віднести чутливість до нерівномірної подачі розчину і, як наслідок – складність регулювання процесу, громіздкість обладнання і складність його обслуговування.

Трубчастий вакуум-випарний апарат

Відрізняються великою конструктивною різноманітністю, але переважне поширення мають апарати, гріюча камера або кип'ятильник яких виконані у вигляді трубчастого теплообмінника. У апаратах даного типу випарювана рідина знаходиться з однієї сторони стінок труб, а теплоносій з іншої. Парорідинна емульсія, що утворюється при випарюванні рідин, розділяється при безперервному виведенні вторинної пари з апарата. Відділення краплинної фази відбувається в сепараторі.

У фармацевтичному виробництві застосовується вакуум-випарний апарат із центральною циркуляційною трубою й природною циркуляцією розчину при випарюванні.

У нижній частині апарату розміщення камеру для нагріву, в центрі якої розташована циркуляційна труба великого діаметру. Нагрітий пар надходить у простір між трубками й обігріває рідину, що подається зі штуцера. У результаті кипіння рідини в трубках утворюється парорідинна емульсія, щільність якої менша від щільності рідини, що нагрівається. У циркуляційній трубці теж проходить випарювання рідини, але щільність парорідинної емульсії більша від щільності емульсії в кип'ятильних трубках, внаслідок чого в апараті відбувається впорядкований рух рідини, тобто природна циркуляція. Відділення крапель рідини від вторинного пару відбувається у сепараторі при русі його через систему відбійників, вторинна пара при цьому потрапляє у конденсатор, а упарений розчин зливається в збірник через штуцер[60].

Роторний вакуум-випарний апарат

Роторний вакуум-випарний апарат набув широкого використання у виробництві антибіотиків. Основною відмінністю від трубчастих є використання не в'язких труб, а однієї, а також наявність спеціальної мішалки (ротора), яка регулює товщину плівки, що стікає внутрішньою поверхнею труби.

Вихідний розчин надходить у верхню частину випарної труби. На осі яка обертається за допомогою електродвигуна, розташовані мішалки за допомогою яких вихідна рідина «розмазується» на внутрішній поверхні труби, утворюючи рівномірну плівку. Лопаті закріплені на шарнірах і під дією відцентрової сили протискаються до внутрішньої поверхні труби. Труба споряджена секційною паровою оболонкою, що дає можливість регулювати інтенсивність випаровування по довжині труби. Екстрапара надходить в сепаратор, в якому за рахунок зменшення швидкості руху за допомогою відбивача відбувається відділення захоплених краплин рідини від пари [60].

Висновок: Для концентрування доцільно використовувати вакуум-випарний апарат, оскільки на випарний апарат подається велика кількість рідини і він дає можливість проводити випарювання за нижчих температур за рахунок створення вакууму, це важливо, оскільки лімонен являє собою легкозаймисту летучу речовину.



Рис 3.3. Вакуум-випарний апарат ВВУ-2000.

Вакуум-випарний апарат ВВУ-2000 призначений для випарювання сировини під низьким тиском і низьких температур, що забезпечує збереження всіх властивості вихідної сировини.

3.3.4. Сушка продукту.

Для сушіння можна використовувати такі методи:

- Пневматичні сушарки;
- Аерофонтанні сушарки та сушарки з псевдозрідженим шаром;
- Розпилювальні сушарки;
- Сублімаційне сушіння;
- Вакуум-сушильні шафи;
- Вальцеві сушарки

Пневматична сушарка є найбільш простою сушаркою, яка заснована на конвективному теплопереносі. Повітря гріють за допомогою калориферу подається разом з матеріалом в сушильну шафу. Сухі частки препарату

відділяються від повітря в циклоні, а відпрацьоване повітря поступає на додаткове очищення у фільтрі[60].

Недоліками даного типу сушарок є те, що вона використовує повітря яке нагріте до високих температур, що може негативно впливати на кінцеві властивості продукту.

Сушарки з псевдозрідженим шаром Принцип дії: основний елемент апарату є конічна вставка в корпусі. Гаряче повітря подається в сушарку на рівні верхньої частини конусу по дотичній, завдяки чому потоки повітря закручуються, викликаючи доцентрові сили, які діють на частинки вологого матеріалу, який подається за допомогою живильника. Усередині конусу, як і в пневматичній сушарці, починається сушіння вологого матеріалу. Втрачаючи вологу частинки починають переходити із завислого стану до руху вгору. На відміну від пневматичної сушарки швидкість руху частинок у міру висихання не збільшується, оскільки у верхній частині конуса швидкість самого повітря зменшується. Це дає можливість зменшити шлях частинки в процесі сушіння. На виході з конуса частинки, які повністю підсушилились, виводяться з апарата, а недовисушені підхоплюються протоком свіжого повітря і повертаються в процес[60].

Недоліком можна вважати надмірну затримку в зоні високої температури, що недопустимо оскільки лімонен легкозаймиста речовина.

Розпилювальні сушарки найбільш широко застосовують для сушіння продуктів мікробіологічного синтезу, оскільки вони забезпечують найшвидше сушіння, не потребують точного забезпечення і витримки потоку теплоносія, температура якого може порівняно невисокою. Вихідний вологий матеріал розпилюється механічними, пневматичними або дисковими розпилювачами у верхній частині камери, і дрібні краплі (зазвичай середній розміром 20-40 мм) падають вниз, контактуючи своєю поверхнею з сушильним агентом, що подається прямо, або протипотоком по відношенню до низхідного руху крапель матеріалу. Висушений до стану сухого порошку продукт знаходиться

на нижньому, кінчному днищі апарату і безперервно вивантажується з апарату через центральний патрубок.

Розпилювальні сушарки відносно стійкі в роботі (при відсутності засмічення механічних або пневматичних форсунок) і дозволяють отримувати висушувани матеріали у вигляді однорідного порошку[60].

Недоліки таких сушарок – в підвищених витратах сушильного агента і енергії, як на нагрівання сушильного агента, так і на розпорошення вихідного рідкого продукту. Габарити розпилювальних сушарок досягають десяти і більше метрів.

Сублімаційне сушіння Сублімаційний (ліофільний) метод сушіння ґрунтується на вилученні вологи з матеріалу, який знаходиться у замороженому стані. При цьому лід переходить в газовий стан, обминаючи рідкий. Більшу частину часу температура сушіння матеріалу коливається в межах $-15\dots-30^{\circ}$. Оскільки процес ведуть при дуже низьких тисках (50/150 Па), то на матеріал не діє не тільки тепло, але й кисень повітря. Заморожування вологого неживого матеріалу труднощів не виникає, але вони виникають при 14 заморожуванні живої біомаси в нормальному середовищі. Якщо занадто швидко заморожувати живу біомасу без вживання запобіжних заходів, кристалики льоду пошкоджують біологічні мембрани і клітини гинуть. Для попередження цього біомасу обробляють спеціальними розчинами, наприклад глюкози, гліцерину тощо, які не дають утворюватися кристаликам з гострими краями. Занадто повільне охолодження теж негативно впливати на кінцевий продукт. Принцип дії сублімаційної сушарки: попередньо заморожений матеріал кладуть на полиці субліматора, що обігрівається парою або гарячою водою. Пара, яка виділяється під час випаровування, потрапляє в конденсатор, де конденсується на його стінках і перетворюється на лід, який скребками видаляється з апарату. Вакуум-насосна установка створює в сушильній камері залишковий тиск 0,1—1,0 мм рт. ст. Цей тиск забезпечує сушіння при температурі 15°C [60].

Вакуум-випарні шафи.

Як і сублімаційні сушарки, вони призначені для сушіння терmostійких матеріалів, але процес відбувається за кімнатної або підвищеної температури, яку витримує матеріал, наприклад, деякі види антибіотиків. Сушіння відбувається періодично, тобто у шафу на полиці закладають вологий матеріал, створюють вакуум, починають обігрівання шафи парою через порожнини в плитах або електричним струмом. Процес закінчують, коли матеріал матиме певну залишкову вологість, після чого готовий сухий матеріал зважують. Принцип дії: у горизонтальному циліндричному корпусі розташовані полиці, на які укладають вологий матеріал. Апарат герметично закривають. Сушильні шафи, як і звичайному вакуум-апарату, споряджають конденсаторами змішувачами і барометричною трубою[60].

Вальцеві сушарки.

У випадках, коли сушінню підлягають пастоподібні або кашоподібні матеріали, які витримують короткострокове сушіння, при порівняно високих температурах, зокрема деякі продукти мікробного синтезу, встановлюють вальцеві сушарки, в яких сушіння відбувається на зовнішній поверхні вальців. Принцип дії: Вальцеві сушарки складаються з одного або двох барабанів, які повільно обертаються в кориті, наповненому матеріалом, що підлягає сушінню. Зсередини ці барабани обігріваються парою. Вальці лише частково занурені в матеріал. Обертаючись, паста наливає на гарячу поліровану поверхню вальців, вирівнюється тонким шаром і під час обертання сушиться. Сухий матеріал зрізають за допомогою ножа і за допомогою шнекового транспорту відводиться від сушарки [60].

Висновок: Під час використання сушарок з псевдозрідженим шаром, розпилювальним сушарками, вальцеві сушарок можлива дія на кінцевий продукт (такі як температура, певні хімічні чинники і т.д.) тому використання даних методів є недоцільним. Таким чином найбільш доцільним є використання вакуум-сушильної шафи за наступних причин: її застосування дає змогу висушити кінцевий продукт без впливу на його хімічні властивості,

оскільки лімонен являє собою легкозаймисту речовину, існує можливість провести дану процедуру при низькій температурі оскільки вакуум-сушильна шафа проводить висушування в вакуумі. А використання ліофільної сушилки недоцільно через дороговизну даного процесу.



Рис 3.4. Вакуум-випарна шафа фірми Wuxi Zhanghua Pharmaceutical Equipment моделі BJYSL-DZF-6020

Вакуум-випарна шафа фірми Wuxi Zhanghua Pharmaceutical Equipment моделі BJYSL-DZF-6020 призначений для висушування випаруваної сировини під низьким тиском , що забезпечує можливість збереження цільового продукту, оскільки лімонен являє собою легкозаймисту речовину.

3.3.5. Подрібнення.

Після вакуум-сушильної шафи утворений осад потрібно подрібнити. Для цього можна використовувати наступні методи:

- Дисмембраторні дробарки;
- Молоткові дробарки;
- Кулькові млини;
- Струминні млини.

Дисмембраторні дробарки – вони представляють собою порожній циліндри в яких розташовані диски, що обертаються від електродвигуна на великій швидкості (приблизно 7...14 тис. об/хв.). На рухомих дисках по концентричних колах розташовані штифти. Між рухомими штифтами по концентричних колах розташовані нерухомі штифти, які закріплені на протилежній стінці порожнього диску. Подрібнення проводять до розміру частинок мікронного порядку[60].

Молоткові дробарки – вони працюють за рахунок відцентрової сили і молотків. Подрібнений матеріал проходить крізь сітку, підхоплюється повітрям і виходить з машини на циклони. Машини цього типу можуть працювати з великими об'ємами продукту який треба подрібнити, а також не вимогливі в обслуговуванні[60].

Кулькові млини – в такому млині головним елементом цих подрібнювачів є кулі, які пересипаються і перетираються матеріали, який потрібно подрібнити.

До кулькових млинів відносять:

1. *Барабанні кулькові млини* є горизонтальними циліндрами, що обертаються, в які закладають кулі. Барабанні кулькові млини є універсальними, але громіздкими.

2. *Кільцеві млини* тіла для подрібнення (кулі) котять по внутрішній поверхні кільця-обійми, в яку закладають матеріал, що підлягає подрібненню. Під дією відцентрової сили або пружинами вони протискаються до поверхні кільця і розчавлюють або перетирають матеріал.

3. *Вібраційні млина* – працюють за рахунок вібрації, при якій кульки інтенсивно вібрують і перетирають матеріал[60].

Недоліки: Кулькові млини достатньо прості, подрібнюють матеріали до потрібного ступеня, але температура матеріалу в млині значно підвищується, в тому в них можна переробляти тільки термостабільні матеріали.

Струмні млини – їх робота ґрунтується на подрібненні у разі зіткнення частинок в потоках стисненого повітря. Спеціальних тіл для подрібнення не

використовують. Такі млини використовують для переробки термолабільних матеріалів, але їх вартість в декілька разів більша ніж у млинів інших типів, а також вони характеризуються великою продуктивністю і їх варто застосовувати для великотоннажних виробництв[60].

Висновок: Проаналізувавши наведені дані робимо висновок, що найбільш доцільним буде використовувати молоткові млини, оскільки вони не вимогливі у використанні, здатні працювати з великими об'ємами сухої речовини і вони забезпечують велику ступінь подрібнення.



Рис 3.5. Молоткова дробарка фірми Jiangxi JXSC Mining Machinery Rc400X300

Для подрібнення висушеного продукту доцільно використати молоткову дробарку Rc400X300. Дана система проста в конструкції, може забезпечувати безперебійність технологічного процесу, потребує мінімального обслуговування.

3.3.6. Просіювання.

Просіювання проводять для того, щоб розділити на фракції, які утворилися в процесі подрібнення. Оскільки утворюється велика кількість сухого продукту, доцільно використовувати крупногабаритні установки для просіювання.

Для просіювання найбільш доцільним є використання просівальну машину фірми Siebtechnik GAS 500, оскільки вона забезпечує швидкість процесу і умовну асептичність процесу просіювання.



Рис 3.6. Просівальна машина Siebtechnik GAS

3.3.7.Фасування.

При виборі упаковки потрібно звертати увагу на властивості самого цільового продукту та умов його зберігання. Для цього треба вибирати таку тару яка б не впливала на якість кінцевого продукту, яка може бути безпечно транспортована і продана. Для цього доцільно використовувати поліетиленові пакети, оскільки такий пакет непроникний для вологи та повітря, що дає змогу зберегти властивість продукту і зручний при транспортуванні.

Фасування проводять за допомогою полуавтоматичної фасувальної машини фірми Ace Pack Machines, в поліетиленові пакети.



Рис 3.7. Аппарат для пакування та запаювання Ace Pack Machines

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

Оскільки лімонен – це харчова ароматична добавка, то доцільно буде використовувати товарну форму у вигляді поліетиленових пакетів, оскільки такий пакет зручний при транспортуванні, непроникний для вологи та повітря, що дає змогу зберегти властивість продукту.

Розділ 4. Матеріальний баланс ділянки ферментації

Продуктовий розрахунок, розрахунок технологічного обладнання, матеріальний баланс на один цикл виробничого біосинтезу ароматизатора лімонена *Escherichia coli* BL21.

Згідно з ТЕО потребою в ароматизатору лімонену *E. coli* BL21 становить 1 330 кг/рік. Таку кількість препарату необхідність виготовити за $T_{рд} = 300$ днів. Згідно з даними, максимальний синтез лімонену (2,7 г/л) досягається при культивуванні штамі BL21 на середовищі наступного складу (г/л):

C₁- Середовище M9 - 0,3 л;

C₂- Гліцерин – 23 мл/л;

C₃- MgSO₄ – 0,6 г/л;

C₅- Діізононілфталат – 0,5 л;

C₆- Ізопропіл-β-D-1-тіоґалактопіранозид – 0,2383 г/л;

C₇- US* мікроелементи – 1 мл.

Посівний матеріал вирощують на поживному середовищі наступного складу (г/л):

C₁- Середовище M9 -0,3 л;

C₂- Гліцерин – 1,5 мл/л;

C₃- MgSO₄ – 0,6 г/л;

C₄- Ізопропіл-β-D-1-тіоґалактопіранозид – 0,2383 г/л;

C₅- US* мікроелементи – 1 мл.

Для подальших розрахунків приймаємо наступні показники:
- час роботи ферментера $T_{цф} = 52$ год (мийка та огляд (2 год), перевірка на герметичність (2 год), стерилізація апарату (2 год), охолодження (1 год), завантаження середовища(1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної

					НУХТ БТЕК 02. 02. 01 КП ПЗ					
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	Розділ 4. Матеріальний баланс ділянки ферментації			Літера	Аркуш	Аркушів
Розробник		Івасенко М.О.								
Керівник		Воронцов О.О.								
Н. контр										
Консульт										
Зав. Каф.		Пирог Т. П.			Кафедра БТМ					

рідини (1 год.) та ферментація (45 год.).

- $K_1=1,1$ – коефіцієнт запасу часу, що враховує можливість нестерильних операцій;

- Сумарні втрати продукту при виробництві $E_{св} = 0,40$;

- Коефіцієнт заповнення ферментера $K_{ф}=0,6$;

- Коефіцієнт заповнення посівного апарата $K_{пш} = 0,6$;

- Коефіцієнт заповнення інокулятора $K_{ин} = 0,6$;

- Коефіцієнт заповнення колб $K_{кол} = 0,2$;

- Коефіцієнт заповнення збірника $K_{зб} = 0,8$;

Розрахунок кількості виробничих циклів.

1.1. Кількість продукту на добу:

$$G_{нтд} = G_{нт}/T_{рд} = 1\ 330/300 = 4,43 \text{ кг/добу.}$$

1.2. Кількість кількості ароматизатору за виробничий цикл:

$$G_{пд} = G_{нтд} \times T_{цф}/24 = 4,43 \times 52/24 = 9,6 \text{ кг/цикл.}$$

1.3. Об'єм КР, що зливається за одну ферментацію (цикл):

$$V_{кр} = K_1 G_{цк} C P_{гп}/P_{кр} \times (1-0,6) = 1,1 \times 8,3 \times 0,94/1,2 \times (1-0,6) = 20,7 \text{ м}^3$$

1.5. Кількість ферментацій (циклів) на рік:

$$N_{цк} = G_{нт}/G_{цк} = 4,43/9,6 = 46 \text{ циклів.}$$

Приготування та стерилізація поживних середовищ для виробничого біосинтезу та вирощування посівного матеріалу.

Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу.

Об'єм готового поживного середовища (ПС) та посівного матеріалу (ПМ) у виробничому ферментері з врахуванням втрат при біосинтезі ($E_{ф}=0,35$), складе:

$$V_{ф} = V_{кр}/(1-E_{ф}) = 20\ 680/(1-0,35) = 31\ 815,38 \text{ л.}$$

Об'єм готового поживного середовища для виробничого ферментера:

$$V_{псф} = V_{ф}/(1+X_{ф}) = 31\ 815,38/(1+0,1) = 28\ 923,07 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу на засів виробничого ферментера:

$$V_{пмф} = V_{ф} - V_{псф} = 31\ 815,38 - 28\ 923,07 = 2\ 892,31 \text{ л.}$$

При вибраному коефіцієнт заповнення ферментера $K_{зф}=0,6$ його приблизний геометричний об'єм складе:

$$V_{гф} = V_{ф}/K_{зф} = 31\,815,38 / 0,6 = 53\,025,63 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{гф} = 60 \text{ м}^3$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$31\,815,38/60\,000=0,53$$

Визначаємо кількість стадій вирощування посівного матеріалу.

Оскільки кількість ПМ становить $X_{ф} = X_{па} = X_1 = X_{колб} = 10\%$ від кількості ПС визначаємо кількість ПМ для інших стадій. Приблизна кількість ПМ для інших стадій становитиме:

ПМ для ферментера з третього інокулятора:

$$V_{пмф} = 2\,892,31 \text{ л.}$$

ПМ для третього інокулятра від другого інокулятра:

$$V_{пмі} = V_{пмф} \times X_{ін} = 2\,892,31 \times 0,1 = 289,23 \text{ л.}$$

ПМ для другого інокулятора від першого інокулятора

$$V_{пмі} = V_{пмф} \times X_{ін} = 289,23 \times 0,1 = 28,92 \text{ л.}$$

ПМ інокулятора з качалочних колб:

$$V_{пмі} = V_{пмф} \times X_{ін} = 28,92 \times 0,1 = 2,89 \text{ л.}$$

Отже, отримання ПМ буде проходити в 4 стадії.

Розрахунок кількості компонентів поживного середовища для виробничого ферментера об'ємом 60 м^3

Оскільки об'єм поживного середовища у ферментері складає $V_{псф} = 28\,923 \text{ л}$, кількість конденсату становитиме $V_{фк} = 28\,923 \times 0,15 = 4\,338 \text{ л}$.

Формування композицій:

Таблиця 4.1

Склад композицій для стерилізації поживного середовища в ферментері об'ємом 60 м³

Об'єм середовища, яке необхідно нейтралізувати	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 28 923 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
1	2	3	4	5
Середовище М9	0,3 л	8 677	А	28 923
Ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозид	0,2383	6,9		
MgSO ₄	0,6	17,3		
Діізононілфталат	0,5 л	4 820,5		
US* мікроелементи	1 мл	28,9		
Вода		11 034,4		
Конденсат 15 %		4 338		
Гліцерин	23 мл/л	665,3	Б	665,3
Σ		28 923		28 923

Композиції А знаходять в реактор-збірник УБС-30 для стерилізації об'ємом 30 м³. Композиція Б не стерилізується.

Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 6 м³

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становить:

$$V_i = \frac{Vi}{1 - E_{па}} = \frac{2\,892,31}{1 - 0,1} = 3\,213,67 \text{ л.}$$

Кількість поживного середовища у інокуляторі становитиме:

$$V_{псі} = \frac{Vi}{1 + X_{па}} = \frac{3\,213,67}{1 + 0,1} = 2\,921,5 \text{ л}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву посівного апарата:

$$V_{пмі} = V_i - V_{псі} = 3\,213,67 - 2\,921,5 = 292,17 \text{ л}$$

Формування композицій:

Таблиця 4.2

Композиції для стерилізації поживного середовища в інокуляторі об'ємом 6 м³

Об'єм середовища, яке необхідно нейтралізувати	Концентрація, г/1 л	Вміст компонента в 2 921,5 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
1	2	3	4	5
Середовище М9	0,3 л	876,45	А	2 000
Ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозид	0,2383	0,696		
Вода		922,85		
Конденсат 10%		200		
MgSO ₄	0,6	1,75	Б	917,12
US* мікроелементи	1 мл	2,9		
Вода		820,7		
Конденсат 10%		91,71		
Гліцерин	1,5 мл/л	4,38	В	4,38
Σ		2 921,5		2 921,5

Композиція А стерилізується в інокуляторі. Для стерилізації композиції Б стерилізується в стерилізаторі об'ємом 1,2 м³. Композиція В не стерилізується.

Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 600 літрів

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становить:

$$V_i = \frac{Vi}{1 - E_{па}} = \frac{292,17}{1 - 0,1} = 324,63 \text{ л.}$$

Кількість поживного середовища у інокуляторі становитиме:

$$V_{псі} = \frac{Vi}{1 + X_{па}} = \frac{324,63}{1 + 0,1} = 295,1 \text{ л.}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву посівного апарата:

$$V_{пмі} = V_i - V_{псі} = 324,63 - 295,1 = 29,53 \text{ л}$$

Формування композицій:

Таблиця 4.3

Композиції для стерилізації поживного середовища в інокуляторі об'ємом 600 літрів

Об'єм середовища, яке необхідно нейтралізувати	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 295,1 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
1	2	3	4	5
Середовище М9	0,3 л	88,5	А	200
Ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозид	0,2383	0,0703		
Вода		91,4		
Конденсат 10%		20		
MgSO ₄	0,6	0,17	Б	94,66
US* мікроелементи	1 мл	0,295		
Вода		84,7		
Конденсат 10%		9,46		
Гліцерин	1,5 мл/л	0,44	В	0,44
Σ		295,1		295,1

Композиція А стерилізується в інокуляторі. Для стерилізації композиції Б стерилізується в стерилізаторі об'ємом 120 літрів. Композиція В не стерилізується.

Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 60 л.

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становить:

$$V_i = \frac{V_i}{1 - E_{\text{па}}} = \frac{29,53}{1 - 0,1} = 32,8 \text{ л.}$$

Кількість поживного середовища у інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{псі}} = \frac{V_i}{1 + X_{\text{па}}} = \frac{32,8}{1 + 0,1} = 29,8 \text{ л.}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву посівного апарата:

$$V_{\text{пмі}} = V_i - V_{\text{псі}} = 32,8 - 29,8 = 3 \text{ л}$$

Формування композицій:

Таблиця 4.4

Композиції для стерилізації поживного середовища в інокуляторі об'ємом 60 літрів

Об'єм середовища, яке необхідно нейтралізувати	Концентрація, г/1 л	Вміст компонента в 29,8 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
1	2	3	4	5
Середовище М9	0,3 л	8,94	А	20
Ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозид	0,2383	0,0071		
Вода		9,05		
Конденсат 10%		2		
MgSO ₄	0,6	0,018	Б	9,76
US* мікроелементи	1 мл	0,03		
Вода		8,7		
Конденсат 10%		0,976		
Гліцерин	1,5 мл/л	0,04	В	0,04
Σ		29,8		29,8

Композиція А стерилізується в інокуляторі. Композиція Б готується в стерилізаторі об'ємом 14 літрів. Композиція В не стерилізується.

Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування в колбах на качалках

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в колбах становить:

$$V_{\text{пмі}} = V_{\text{кол}} = 3 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища в колбах становить:

$$V_{\text{пск}} = V_{\text{пмі}} / (1 + X_{\text{кол}}) = 3 / (1 + 0,1) = 2,72 \text{ л.}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засівання колб, л:

$$V_{\text{пмк}} = V_{\text{пмі}} - V_{\text{пск}} = 3 - 2,72 = 0,28 \approx 280 \text{ мл.}$$

3.4.1.Формування композицій:

Таблиця 4.5

Склад композицій для стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

Об'єм середовища, яке необхідно нейтралізувати	Концентрація, г/1 л	Вміст компонента в 2,72 л середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
1	2	3	4	5
Середовище М9	50 мл/л	0,136	А	1,5
Гліцерин	0,5 мл/л	0,0013		
Ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозид	0,2383	0,648		
Вода		0,71		
MgSO ₄	0,242	0,65	Б	1,22
US* мікроелементи	1 мл	0,0027		
Вода		0,56		
Σ		2,72		2,72

Усі композиції готуються у лабораторному посуді і стерилізуються в автоклаві.

Матеріальний баланс на один цикл виробничного біосинтезу

Таблиця 4.6

№ з/п	Використано		Отримано	
	Назва сировини і напівпродукту	Кількість, кг, дм ³	Назва кінцевого продукту, відходів та втрат	Кількість кг, дм ³
1	2	3	4	5
1.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ІНОКУЛЯТУ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ (мл, г)			
1.1.	Декстрин	0,136	Нестерильне ПС	2 720
1.2.	Гліцерин	0,0013		
1.3.	Ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозид	0,648		
1.4.	MgSO ₄	0,65		
1.5.	US* мікроелементи	0,0027		
1.6.	Вода	1,27		
	Всього:	2 720	Всього:	2 720
2.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА В АВТОКЛАВІ (мл)			
2.1.	Нестерильне ПС	2720	Стерильне ПС	2720
	Всього:	2720	Всього:	2720
3.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ ПІД ЧАС КУЛЬТИВУВАННЯ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ (мл)			
3.1.	Стерильне ПС	2720	Посівний матеріал	3000
3.2.	Посівний матеріал	280		
	Всього:	3000	Всього:	3000
4.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА			
4.1.	Середовище М9	8,9	Нестерильне ПС	26,78
4.2.	Ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозид	0,0071		
4.3.	MgSO ₄	0,018		
4.4.	US* мікроелементи	0,03		

1	2	3	4	5
4.5	Гліцерин	0,04		
4.6.	Вода	17,79		
	Всього:	26,78	Всього:	26,78
5.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА (л)			
5.1	Нестерильне ПС	26,78	Стерильне ПС	29,8
5.2	Конденсат	2,976	(втрат немає)	
	Всього:	29,8	Всього:	29,8
6.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ІНОКУЛЯТОРІ (л)			
6.1	Стерильне ПС	29,8	Посівний матеріал	29,8
6.2	Посівний матеріал з колб на качалках	3		
6.3	Втрати (частка)	0,1	Втрати (кількість)	3
	Всього:	32,8	Всього:	32,8
7.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА (кг, л)			
7.1	Середовище М9	88,5	Нестерильне ПС	265,5
7.2	Ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозид	0,0703		
7.3	MgSO ₄	0,17		
7.4	US* мікроелементи	0,295		
7.5	Гліцерин	0,44		
7.6	Вода	176,1		
	Всього:	265,5	Всього:	265,5
8	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА (л)			
8.1	Нестерильне ПС	265,5	Стерильне ПС	295,1
8.2	Конденсат	29,51	(втрат немає)	
	Всього:	295,1	Всього:	295,1
9	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ІНОКУЛЯТОРІ (л)			
9.1	Стерильне ПС	295,1	Посівний матеріал	295,1
9.2	Посівний матеріал з інокулятора	29,53		
9.3	Втрати (частка)	0,1	Втрати (кількість)	29,53
	Всього:	324,63	Всього:	324,63
10	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА (г, л)			

1	2	3	4	5
10.1	Середовище М9	876,45	Нестерильне ПС	2 629,72
10.2	Ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозид	0,696		
10.3	MgSO ₄	1,75		
10.4	US* мікроелементи	2,9		
10.5	Гліцерин	4,38		
10.6	Вода	1743,55		
	Всього	2 629,72	Всього	2 629,72
11.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА (л)			
11.1	Нестерильне ПС	2 629,33	Стерильне ПС	2 921,5
11.2	Конденсат	291,71	(втрат немає)	
	Всього:	2 921,5	Всього:	2 921,5
12	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ІНОКУЛЯТОРІ (л)			
12.1	Стерильне ПС	2 921,5	Посівний матеріал	2 921,5
12.2	Посівний матеріал з інокулятора	292,17		
12.3	Втрати (частка)			292,17
	Всього:	3 213,67		3 213,67
13	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ФЕРМЕНТЕРА (кг, л)			
13.1	Середовище М9	8 677	Нестерильне ПС	24 585
13.2	Ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозид	6,9		
13.3	MgSO ₄	17,3		
13.4	US* мікроелементи	28,9		
13.5	Діізононілфталат	4 820,5		
13.6	Вода	11 034,4		
	Всього:	24 585	Всього	24 585
14.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА (л)			
14.1	Нестерильне ПС	24 585	Стерильне ПС	28 923
14.2	Конденсат	4 338	(втрат немає)	
	Всього:	28 923	Всього:	28 923
15	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ФЕРМЕНТЕРІ (л)			
	Стерильне ПС	28 923	Культуральна рідина	28 923

1	2	3	4	5
	Посівний матеріал з малого інокулятора	2 892,31		
	Втрати (частка)		Втрати (кількість)	2 892,31
	Всього:	31 815,31	Всього:	31 815,31

Розрахунок та підбір ємнісної апаратури.

Уточнюючий розрахунок ферментаційного обладнання.

Уточнюючий розрахунок кількості ферментерів.

Приблизний загальний геометричний об'єм ферментерів при заданому $K_3=0,5\dots0,6$:

$$V_{\text{гф}} = V_{\text{ф}}/K_3 = 31\,815,31/0,6 = 53\,025,51 \text{ л.}$$

Вибираємо з таблиці найближчий номінальний об'єм ферментера: $V_{\text{нф}} = 60 \text{ м}^3$. Кількість виробничих ферментів при заданому K_3 :

$$N_{\text{фр}} = V_{\text{гф}}/V_{\text{нф}} = 53\,025,51/60\,000 = 0,88 \approx 0,9 - \text{приймаємо } 1.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці ферментерів:

$$K_{3\text{ф}} = V_{\text{ф}}/(V_{\text{нф}} \times N_{\text{фр}}) = 31\,815,31/(60\,000 \times 1) = 0,53$$

Уточнюючий розрахунок кількості інокуляторів для отримання 3 213,67 літрів посівного матеріалу.

Приблизний загальний геометричний об'єм інокулятора при заданому $K_3=0,5\dots0,6$:

$$V_{\text{гін}} = V_{\text{ін}}/K_3 = 3\,213,67/0,6 = 5\,356,11 \text{ л.}$$

Вибираємо з таблиці найближчий номінальний об'єм інокулятору: $V_{\text{ін}} = 6 \text{ м}^3$. Кількість інокуляторів при заданому $K_{3\text{ін}}$:

$$N_{\text{інр}} = V_{\text{гін}}/V_{\text{нін}} = 5\,356,11/6000 = 0,89 \approx 0,9.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці інокулятора:

$$K_{3\text{ін}} = V_{\text{ін}}/(V_{\text{нін}}N_{\text{інр}}) = 3\,213,67/6\,000 = 0,54.$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує задані межі (0,5-0,6) приймаємо до установки інокуляторів $N_{\text{інр}} + 1$ запасний.

Уточнюючий розрахунок кількості інокуляторів для отримання 324,63 літрів посівного матеріалу.

Приблизний загальний геометричний об'єм інокулятора при заданому $K_3=0,5\dots0,6$:

$$V_{\text{гін}} = V_{\text{ін}}/K_3 = 324,63/0,6=541,05 \text{ л.}$$

Вибираємо з таблиці найближчий за номінальний об'ємом інокулятор: $V_{\text{ін}} = 600 \text{ л.}$

Кількість інокулятор при заданому $K_{\text{зін}}$:

$$N_{\text{інр}} = V_{\text{гін}}/ V_{\text{нін}} = 541,05/600= 0,9 - \text{приймаємо } 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці інокулятор:

$$K_{\text{зін}} = V_{\text{ін}}/ (V_{\text{нін}}N_{\text{інр}}) = 324,63/(600 \times 1) = 0,54$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує задані межі (0,5-0,6) приймаємо до установки інокуляторів $N_{\text{інр}} + 1$ запасний.

Уточнюючий розрахунок кількості інокуляторів для отримання 32,8 літрів посівного матеріалу.

Приблизний загальний геометричний об'єм інокулятора при заданому $K_3=0,5\dots0,6$

$$V_{\text{гін}} = V_{\text{ін}}/K_3 = 32,8/0,6=54,666 \approx 55 \text{ л.}$$

Вибираємо з таблиці найближчий за номінальний об'ємом інокулятор: $V_{\text{ін}}=60 \text{ л.}$ Кількість інокуляторів при заданому $K_{\text{зін}}$:

$$N_{\text{інр}} = V_{\text{гін}}/ V_{\text{нін}} = 55/60=0,92 - \text{приймаємо } 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці інокулятор:

$$K_{\text{зін}} = V_{\text{ін}}/ (V_{\text{нін}}N_{\text{інр}}) = 32,8/(60 \times 1)=0,55$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує задані межі (0,5-0,6) приймаємо до установки інокулятор $N_{\text{інр}} + 1$ запасний.

Уточнюючий розрахунок кількості качалочних колб

Приблизний загальний необхідний об'єм качалочних колб при заданому $K_{\text{колб}}=0,2$:

$$V_{\text{Гколб}} = V_{\text{колб}}/K_{\text{колб}}=3000/0,2=15\ 000 \text{ мл}$$

Об'єм 1 качалочної колби $V_{\text{нколб}} = 750 \text{ мл.}$

Кількість качалочних колб при заданому $K_{\text{колб}} = 0,2$:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{Гколб}}/V_{\text{нколб}} = 15000/750 = 20 \text{ колб.}$$

Розрахунок об'єму установки безперервної стерилізації для виробничого ферментеру

Об'єм готового поживного середовища у виробничому ферментері становить:

$$V_{\text{псф}} = 28\,923 \text{ л.}$$

Об'єм стерилізованого поживного середовища:

$V_{\text{ст}} = 28\,923 - 4\,338 = 24\,585 \text{ л.}$ Отже, стерилізацію проводять в УБС потужністю 30 м^3 .

Час стерилізації становить:

$$\tau_{\text{ст}} = 24\,585/30\,000 = 0,82 \text{ год} = 49,2 \approx 50 \text{ хв.}$$

Стерилізоване поживне середовище з УБС передається безпосередньо в ферментер.

Приблизний загальний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{\text{зб}} = 0,7 \dots 0,8$.

$$V_{\text{убс}} = 24\,585/0,8 = 30\,731,25$$

Вибираємо найближчий за об'ємом реактор $V_{\text{рт}} = 40 \text{ м}^3$

Кількість реакторів:

$$N_{\text{р}} = V_{\text{Апа}}/V_{\text{рст}} = 30\,731,25/40\,000 = 0,77 - \text{приймаємо } 1.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зр}} = V_{\text{Апа}}/(V_{\text{рст}} \times N_{\text{р}}) = 24\,585/40\,000 = 0,6$$

Оскільки дане значення $K_{\text{зр}}$ знаходиться в прийнятих межах (0,6 - 0,7), тому приймаємо до установки одну УБС потужністю 30 м^3 з реактором-змішувачем об'ємом 40 м^3 .

Уточнюючий розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування композиції А для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 6 м^3 .

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації композиції А. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{\text{зб}} = 0,7 \dots 0,8$.

$$V_{\text{Апа}} = V_{\text{А}}/K_{\text{зб}} = 2000/0,8 = 2\,500$$

З таблиці беремо стандартний реактор змішувач на 2500 л. Кількість реакторів при заданому $K_{\text{зб}}$ становить:

$$N_p = V_{\text{Апа}}/V_{\text{рст}} = 2500/2500 = 1 \text{ – приймаємо } 1.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{зр} = V_{\text{Апа}}/(V_{\text{рст}} \times N_p) = 2000/2500 = 0,8$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний.

Уточнюючий розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування композиції Б для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 6 м³.

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації композиції Б. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{зб} = 0,7 \dots 0,8$:

$$V_{\text{Апа}} = V_A/K_{зб} = 917,12/0,8 = 1\ 146,4 \text{ л.}$$

З таблиці беремо стандартний реактор-змішувач на 1200 л. Кількість реакторів при заданому $K_{зб}$ становить:

$$N_p = V_{\text{Апа}}/V_{\text{рст}} = 1\ 146,4/1200 = 0,95 \text{ – приймаємо } 1.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{зр} = V_{\text{Апа}}/(V_{\text{рст}} \times N_p) = 917,12/1200 = 0,76$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції Б – 1 + 1 запасний.

Уточнюючий розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування композиції А для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 600 літрів.

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації композиції А. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{зб} = 0,7 \dots 0,8$:

$$V_{\text{Апа}} = V_A/K_{зб} = 200/0,8 = 250 \text{ л.}$$

З таблиці беремо стандартний-змішувач на 250 л. Кількість реакторів при заданому $K_{зб}$ становить:

$$N_p = V_{\text{Апа}}/V_{\text{рст}} = 250/250=1.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{зр} = V_{\text{Апа}}/(V_{\text{рст}} \times N_p) = 200/250=0,8$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний.

Уточнюючий розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування композиції Б для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 600 літрів.

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації композиції Б. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{зб} = 0,7 \dots 0,8$:

$$V_{\text{Апа}} = V_A/K_{зб} = 94,66/0,8=118,3 \text{ л.}$$

З таблиці беремо стандартний реактор-змішувач на 120 літрів. Кількість реакторів-змішувачів при заданому $K_{зб}$ становить:

$$N_p = V_{\text{Апа}}/V_{\text{рст}} = 118,3/120 = 0,99 - \text{приймаємо } 1.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{зр} = V_{\text{Апа}}/(V_{\text{рст}} \times N_p) = 94,66/120=0,78$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції Б – 1 + 1 запасний.

Уточнюючий розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування композиції А для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 60 літрів.

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації композиції А. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{зб} = 0,7 \dots 0,8$:

$$V_{\text{Апа}} = V_A/K_{зб} = 20/0,8=25 \text{ л.}$$

З таблиці беремо стандартний-змішувач на 25 л. Кількість реакторів при заданому $K_{зб}$ становить:

$$N_p = V_{\text{Апа}}/V_{\text{рст}} = 25/25=1.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{зр} = V_{\text{Апа}}/(V_{\text{рст}} \times N_p) = 20/25=0,8$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний.

Уточнюючий розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування композиції Б для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 60 літрів.

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації композиції Б. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{зб} = 0,7 \dots 0,8$:

$$V_{\text{Апа}} = V_{\text{А}}/K_{зб} = 9,76/0,8=12,2 \text{ л.}$$

З таблиці беремо стандартний реактор-змішувач на 14 літрів. Кількість реакторів-змішувачів при заданому $K_{зб}$ становить:

$$N_p = V_{\text{Апа}}/V_{\text{рст}} = 12,2/14 = 0,87 - \text{приймаємо } 1.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{зр} = V_{\text{Апа}}/(V_{\text{рст}} \times N_p) = 9,76/14=0,7$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції Б – 1 + 1 запасний.

Уточнюючий розрахунок кількості колб для приготування композиції А для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці.

Приблизний об'єм поживного середовища для приготування та стерилізації композиції А. Приблизний об'єм колби при заданому $K_{зб} = 0,3-0,5$:

$$V_{\text{Апа}} = V_{\text{Б}}/K_{зб} = 1,5/0,5 = 3 \text{ л.}$$

Беремо колбу об'ємом 3 літрів.

Кількість колб при заданому $K_{зб}$ становить:

$$N_p = V_{\text{Бколб}}/V_{\text{рст}} = 3/3=1 - \text{приймаємо } 1.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення колби:

$$K_{зр} = V_B / (V_{рст} \times N_p) = 1,5/3=0,5.$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,3-0,5), приймаємо кількість колб для приготування композиції А – 1 + 1 запасна.

Уточнюючий розрахунок кількості колб для приготування композиції Б для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці.

Приблизний об'єм поживного середовища для приготування та стерилізації композиції Б. Приблизний об'єм колби при заданому $K_{зб} = 0,3-0,5$:

$$V_{Апа} = V_B / K_{зб} = 1,22/0,5=2,44$$

Бермо колбу об'ємом 3 літри. Кількість колб при заданому $K_{зб}$ становить:

$$N_p = V_{Бколб} / V_{рст} = 2,44/3=0,8 - \text{приймаємо } 1.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення колби:

$$K_{зр} = V_B / (V_{рст} \times N_p) = 1,22/3 = 0,4.$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,3-0,5), приймаємо кількість колб для приготування композиції Б – 1 + 1 запасний

Розділ 5. Специфікація обладнання

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу ароматизатору лімонену наведено у табл. 5.1.

Таблиця 5.1.

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
ПЗ-1	Пристрій для забору повітря	1	Повітрозбірник А1И 019.000-02 Фірма: «НПЦ Вектор-Кондвент». Повітрозабірник, обладнаний металевією сіткою для видалення механічних забруднень ²
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр G4. Фільтруючий матеріал – скловолокно, Площа фільтруючої поверхні 1,6 м ² , продуктивність 2800 м ³ /год (0,78 м ³ /с) Виробник: Компанія «Фармстрой», Росія ³
К-3	Компресор	1	Компресор Ессоair F22 з винтовим приводом. Максимальний робочий тиск 1,0 МПа. Виробник: «Ессоair» (Туреччина). ⁴
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Охолоджувач повітря СWK 160-3-2,5 (SYSTEMAIR). Максимальний робочий тиск 1,6 МПа, вихідна температура повітря 20 °С. Виробник: «SYSTEMAIR» ⁵
Р-5	Ресивер	1	Ресивер Об'єм 500 л, робочий тиск 1,0 МПа. Виробник: <u>ООО "Компрессормаш-Сервис"</u> (Україна). ⁶
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Повітренагрівач водяний VBC (Systemair). Максимальний робочий тиск 300 Па, робоча температура 150 °С. Виробник: «Systemair» (Швеція). ⁵
Ф-7	Головний фільтр очистки повітря	1	Панельний осередковий фільтр класу F9. Фільтруючий матеріал мікроскловолокно. Максимальна робоча температура: 300 °С. Ступінь очищення становить 90- 99 % ⁷
Ф-10, Ф-12, Ф-13, Ф-14	Індивідуальний фільтр очистки повітря	2	Фільтр повітряний P-SRF V. Діапазон температур від -20 до 200 °С, ступінь очищення повітря фільтром становить 99,999 %. ⁸

<i>НУХТ БТЕК 02. 02. 01 КП ПЗ</i>				
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>
<i>Розробник</i>		<i>Івасенко М.О.</i>		
<i>Керівник</i>		<i>Воронцов О.О</i>		
<i>Н. контр</i>				
<i>Консульт</i>				
<i>Зав. Каф.</i>		<i>Пирог Т. П.</i>		
<i>Розділ 5. Специфікація обладнання</i>				
			<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>
<i>Кафедра БТМ</i>				

Продовження таблиці 5.1

1	2	3	4
Ін-60	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 60 л, оснащений сорочкою, барботером, трубою перетискування, пробовідбірником, лопатевою мішалкою (до 20-1500 об/хв), сталь AISI 304. Виробник: «Ningbo» ⁹
СТ-14	Стерилізатор	1	Стерилізатор об'ємом 14 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (100 об/хв), виготовлений зі сталі 12Х18Н10Т. Виробник: «Красный октябрь» (Україна). ¹
РЗ-15	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач об'ємом 40 м ³ , оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (100 об/хв), виготовлений зі сталі 12Х18Н10Т. Виробник: «Красный октябрь» (Україна). ¹
РЗ-21	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач об'ємом 25 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (100 об/хв), виготовлений зі сталі 12Х18Н10Т. Виробник: «Красный октябрь» (Україна). ¹
РЗ-17	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач об'ємом 250 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (100 об/хв), виготовлений зі сталі 12Х18Н10Т. Виробник: «Красный октябрь» (Україна). ¹
СТ-18	Стерилізатор	1	Стерилізатор об'ємом 120 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (100 об/хв), виготовлений зі сталі 12Х18Н10Т. Виробник: «Красный октябрь» (Україна). ¹
СТ-19	Стерилізатор	1	Стерилізатор об'ємом 1,2 м ³ , оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (100 об/хв), виготовлений зі сталі 12Х18Н10Т. Виробник: «Красный октябрь» (Україна). ¹
РЗ-20	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач об'ємом 2,5 м ³ , оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (100 об/хв), виготовлений зі сталі 12Х18Н10Т. Виробник: «Красный октябрь» (Україна). ¹
НВ-21	Насос-відцентровий	1	Насос відцентровий герметичний НСМ з нержавіючої сталі. Продуктивність: до 30 м ³ / год (Італія) ⁶

Продовження таблиці 5.1

1	2	3	4
УБС-30	Установка безперервної стерилізації	1	Установка складається з: реактора-змішувача (РЗ-15) теплообмінника-рекуператора (Т-23), колонок для стерилізації поживного середовища (К-24) теплообмінника рекуператора пластинчастого (Т-25).
З-31	Збірник культуральної рідини	1	Реактор-змішувач об'ємом 40 м ³ , оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (100 об/хв), виготовлений зі сталі 12Х18Н10Т. Виробник: «Красный октябрь» (Україна). ¹
НВ-32	Насос-відцентровий	2	Насос відцентровий герметичний NCM з нержавіючої сталі. Продуктивність: до 25 м ³ / год ⁶
Ц-33	Центрифуга	1	Над-центрифуга ОГШ-2022К-05, 8 тис.об/хв, 3000 л/год. Вирбник: Сумське НПО (Україна) ¹¹
З-34	Збірник для супернатанту	1	Збірник об'ємом 30 000 літрів, оснащений перемішувальним пристроєм (100 об/хв). Виробник: «Красный октябрь» (Україна). ¹
З-35	Збірник для осаду	1	Збірник об'ємом 10 000 літрів. Виробник: «Красный октябрь» (Україна). ¹
УУ-37	Ультрафільтраційна установка	1	Ультрафільтраційна установка Bucher Uktra Star XL з мембранами від компанії Міліпор, розмір пор 10 нм. Швейцарія ¹²
ВВУ-38	Вакуум-випарний апарат	1	Вакуум-випарна установка ВВУ-2000, продуктивність 2000 л/год, 40% сухих речовин. Україна ¹³ .
З-39	Збірник	1	Збірник об'ємом 400 літрів, оснащений перемішувальним пристроєм (100 об/хв). Виробник: «Красный октябрь» (Україна). ¹

Продовження таблиці 5.1

<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
ВВШ-40	Вакуум-випарна шафа	1	Вакуум-випарна шафа ВJYSL-DZF-6020, тиск 0,006 МПА, температура 50 °С. Виробник: Wuxi Zhanghua Pharmaceutical Equipment, Китай ¹⁴ .
МД-41	Молоткова дробарка	1	Молоткова дробарка, швидкість 14 тис.об/хв, модель Pc400X300 Виробник: Jiangxi JXSC Mining Machinery, Китай ¹⁵ .
ПС-42	Просіювання	1	Просіювальна установка з діаметром пор сита 1 мм Siebtechnik GAS, модель GAS 500. Україна ¹⁶ .
ПМ-43	Напівавтоматична пакувальна машина	1	Напівавтоматична пакувальна машина фірми Ace Pack Machines Індія ¹⁷ .
З-44	Збірник	1	Збірник об'ємом 20 000 літрів, оснащений перемішувальним пристроєм (100 об/хв). Виробник: «Красный октябрь» (Україна). ¹
ПН-45	Перистальтичний насос	4	Насос перистальтичний герметичний ВН-3V. Продуктивність : до 100 л/ год ¹⁰
НВ-46	Насос-відцентровий	1	Насос відцентровий герметичний NCM з нержавіючої сталі. Продуктивність: до 250 л / год (Італія) ⁶
НВ-47	Насос-відцентровий	1	Насос відцентровий герметичний NCM з нержавіючої сталі. Продуктивність: до 25 л / год (Італія) ⁶

Закінчення таблиці 5.1

1	2	3	4
РЗ-48	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач об'ємом 25 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (100 об/хв), виготовлений зі сталі 12Х18Н10Т. Виробник: «Красный октябрь» (Україна). ¹
НВ-49	Насос-відцентровий	1	Насос відцентровий герметичний NCM з нержавіючої сталі. Продуктивність: до 2,5 м ³ / год (Італія) ⁶
НВ-50	Насос-відцентровий	1	Насос відцентровий герметичний NCM з нержавіючої сталі. Продуктивність: до 1 м ³ / год (Італія) ⁶
НВ-51	Насос-відцентровий	1	Насос відцентровий герметичний NCM з нержавіючої сталі. Продуктивність: до 10 л / год (Італія) ⁶
НВ-52	Насос-відцентровий	1	Насос відцентровий герметичний NCM з нержавіючої сталі. Продуктивність: до 100 л / год (Італія) ⁶
НВ-53	Насос-відцентровий	1	Насос відцентровий герметичний NCM з нержавіючої сталі. Продуктивність: до 200 л / год (Італія) ⁶
Ін-600	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 600 л, оснащений сорочкою, барботером, трубою перетискування, пробовідбірником, лопатевою мішалкою (до 20-1500 об/хв), сталь AISI 304. Виробник: «Ningbo» ⁹
Ін-6000	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 6 м ³ , оснащений сорочкою, барботером, трубою перетискування, пробовідбірником, лопатевою мішалкою (до 20-1500 об/хв), сталь AISI 304. Виробник: «Ningbo» ⁹
ФР. 60 000	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 60 м ³ . Оснащений барботером, сорочкою, пробовідбірником, лопатевою мішалкою (300 об/хв). Виробник: «Ningbo».9

- 1- <http://www.chimmash.com.ua/reaktor.htm>
- 2- http://montazh-zao.ru/vozduhosbornik_A1I_019_020.html
- 3- <http://www.pharmfilter.ru/filters/panelairfilters/g3.htm>
- 4- <https://eccoair.ua/nashaprodukciya/eccoair-f22> («Еккоєір технології стисненого повітря, обладнання для підготовки повітря).
- 5- <https://ventilator.ua/ua/product/systemair-cwk-160-3-2-5/>
- 6- <http://www.ascopumps.com.ua/ua/products/centrifugal/singlesta-ge/ncm.html#fragment-13>
- 7- http://newfilter.com.ua/ru/ventiljacionnie_filtri/karmannye-filtry-f5-f9-dlya-ventilyatsii-_izgotovlenie-karmannikov.html
- 8- <https://www.donaldson.com/en-us/compressed-air-process/products/compressed-air-gas/filter-elements/sterile-elements/p-srf-v/>
- 9- <https://ruianglobal.en.made-in-china.com/product/IXPQdCKxZYpS/China-High-Efficiency-Automatic-Yeast-Bacteria-Biological-Germs-Beer-Wine-Fermentation-Tank-Fermenter.html>
- 10- https://www.etatron.com.ua/pumps/peristaltic_pumps/bh3-v/
- 11- <http://snpo.ua/uk/golovna/>
- 12 - <https://www.bucherunipektin.com/>
- 13 - <https://tehtank.com/catalog/proizvodstvo-sgushchennogo-moloka/vvu-200/>
- 14 - https://russian.alibaba.com/product-detail/vacuum-oven-drying-equipment-industrial-cabinet-vegetables-fruit-tray-dryer-1600057517251.html?spm=a2700.galleryofferlist.topad_creative.d_title.d5855d47UYCNpN
- 15 - https://russian.alibaba.com/product-detail/good-quality-industrial-wet-coal-crusher-small-hammer-mill-crusher-pulverizer-pc400x300-hammer-crusher-for-sale-62479207827.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.6bff4c1e01jRgR&s=p
- 16 - <http://ventalab.ua/products/krupnogabaritnaya-proseivayushaya-mashina-siebtechnik-gas>
- 17 - <https://www.indiamart.com/proddetail/automatic-spice-packaging-machine-10933858055.html>

Розділ 6. Опис технологічної схеми

Технологічна схема одержання культуральної рідини *E. coli* BL21 включає допоміжні роботи (підготовка повітря, підготовка і стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу та біосинтез ароматизатору штаму BL21).

Технологічну схему одержання культуральної рідини *E. coli* BL21 наведено у графічній частині курсової роботи.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирають через повітрозабірник (ПЗ-2) на висоті 3 м над дахом, де концентрація пилових часток і мікроорганізмів є мінімальною.

ДР 2.2. Попереднє грубе очищення повітря

Попередню очистку повітря здійснюють у фільтрі (Ф-3), що забезпечує ступінь очищення 80%. При проходженні повітря через фільтр грубого очищення, пил, механічні частки діаметром 5–10 мкм затримуються, знижується кількість контамінантів.

ДР 2.3. Компресування повітря

Стиснення повітря відбувається за допомогою компресора (К-4), при цьому створюється тиск величиною 0,4 Мпа, температура повітря підвищується від 120 до 250°C. Знищується значна кількість контамінуючої мікрофлори.

ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення зайвої вологи

Для видалення вологи, що утворилася при компресуванні, повітря піддають швидкому охолодженню до 19 °С у теплообмінному апараті (Т-5), далі видалену вологу подають на ресивер (Р-6), у якому відбувається

					<i>НУХТ БТЕК 02. 02. 01 КП ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>Розділ 6. Опис технологічної схеми</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробник</i>		<i>Івасенко М.О.</i>						
<i>Керівник</i>		<i>Воронцов О.О.</i>						
<i>Н. контр</i>								
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. Каф.</i>		<i>Пирог Т. П.</i>				<i>Кафедра БТМ</i>		

видалення конденсату до $W = 60 \%$.

ДР 2.5. Нагрівання повітря

З метою запобігання утворення конденсату пари, на волокнах головного та індивідуальних фільтрів, охоложене повітря у теплообміннику (Т-7) нагрівають до температури $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

ДР 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Повітря пропускають через головний фільтр (Ф-8), в якому фільтрувальним матеріалом є мікроскловолокно. Ступінь очищення становить $E = 95 \%$.

ДР 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Перед кожним апаратом встановлюють індивідуальний фільтр (Ф-10., Ф-12., Ф-13., Ф-14), в якому фільтруючим матеріалом є боросилікат. Ступінь очищення становить $E = 99,999 \%$.

ДР 3. Приготування та стерилізація поживного середовища.

ДР 3.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалці

ДР 3.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують $0,648 \text{ г}$ Ізопропіл- β -D-1-тіогалактопіранозид, після чого в колбу об'ємом 3 літрів вносять $0,136 \text{ мл}$ середовища М9 і $0,0013 \text{ л}$ гліцерину і додають 710 мл води, закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують при $112 \text{ }^\circ\text{C}$ упродовж 30 хв .

ДР 3.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують $0,65 \text{ г}$ MgSO_4 і $0,0027 \text{ мл}$ US* мікроелементів вносять у колбі об'ємом $1,5 \text{ літрів}$, додають 560 мл води, закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують при 131°C упродовж 40 хв .

ДР 3.1.3. Змішування композицій

Після стерилізації композиції А і Б їх переносять в асептичних умовах в колбу об'ємом 3 літри , проводять перевірку на відсутність мікробіоти.

Вміст компонентів для приготування 2,72 л середовища наведено у таблиці 6.1

Таблиця 6.1

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 2,72 л середовища

Об'єм середовища, яке необхідно нейтралізувати	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 2,72 л середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
1	2	3	4	5
Середовище М9	50 мл/л	0,136	А	1,5
Гліцерин	0,5 мл/л	0,0013		
Ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозид	0,2383	0,648		
Вода		0,71		
MgSO ₄	0,242	0,65	Б	1,22
US* мікроелементи	1 мл	0,0027		
Вода		0,56		
Σ		2,72		2,72

ДР 3.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 60 л.

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 32,8 літрів поживного середовища. Враховуючи об'єм посівного матеріалу (3 літри) від ТП 3.4.

ДР 3.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 7,1 г Ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозид, вводять 8,9 літрів середовища М9 в реактор-змішувач об'ємом 25 літрів, через об'ємно ваговий дозатор додають 9,09 літрів питної води, вмикають мішалку та подають пару в сорочку до температури 30-40 °С для повного розчинення композиції групи А. Після чого за допомогою відцентрового насоса (НС-21) перекачують в інокулятор (ІН-60). Після чого в сорочку апарату подають пару до температури 80-90 °С, далі в апарат подають гостру пару до температури 112 °С протягом 30 хв.

ДР 3.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 18 грамів MgSO₄, набирають 30 мл US* мікроелементів і вносять стерилізатор об'ємом 15 літрів (СТ-14), через

об'ємно-ваговий дозатор додають 8,7 літрів питної води, вмикають мішалку та подають пару в сорочку до температури 30-40 °С для повного розчинення композиції Б. Після чого в сорочку апарату подають пару до температури 80-90 °С, далі в апарат подають гостру пару до температури 131 °С протягом 40 хвилин, потім за допомогою відцентрового насосу (НВ-21) переносять поживне середовище в інокулятор(ІН-60).

ДР 3.2.3. Композиції В

Після того, як в ферментері простерилізувалась композиція А в нього вводять 40 мл гліцерину в інокулятор через гребінку.

Всі компоненти для приготування 29,8 л поживного середовища наведено в таблиці 6.2.

Таблиця 6.2.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 29,8 л середовища.

Об'єм середовища, яке необхідно нейтралізувати	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 29,8 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
Середовище М9	0,3 л	8,9	А	20
Ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозид	0,2383	0,0071		
Вода		9,09		
Конденсат 10%		2		
MgSO ₄	0,6	0,018	Б	9,76
US* мікроелементи	1 мл	0,03		
Вода		8,7		
Конденсат 10%		0,976		
Гліцерин	1,5 мл/л	0,04	В	0,04
Σ		29,8		29,8

ДР 3.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирошування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 600 л.

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 324,63 л поживного середовища. Враховуючи об'єм посівного матеріалу (29,53 л) від ДР 3.2.

ДР 3.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 70,3 грамів Ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозид, вводять 88,5 літрів середовище М9 в реактор-змішувач об'ємом 250 літрів, через об'ємно ваговий дозатор додають 91,4 літрів питної води, вмикають мішалку та подають пару в сорочку до температури 30-40 °С для повного розчинення композиції А. Після чого за допомогою відцентрового насосу (НС-21) перекачують в інокулятор (ІН-600). Після чого в сорочку апарату подають пару до температури 80-90 °С, далі в апарат подають гостру пару до температури 112 °С протягом 30 хв.

ДР 3.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 170 грамів MgSO₄, набирають 295 мл US* мікроелементів вносять в стерилізатор об'ємом 120 літрів (СТ-18), після чого в стерилізатор через об'ємно ваговий дозатор додають 84,7 літрів питної води, вмикають мішалку та подають пару в сорочку до температури 30-40 °С для повного розчинення композиції Б. Після чого в стерилізатор подають гостру пару та стерилізують при температурі 131 °С протягом 40 хв. Після охолодження простерилізоване поживне середовище перекачують в інокулятор (ІН-600) за допомогою відцентрового насосу (НС-21).

ДР 3.3.3. Композиції В

Після того, як в ферментері простерилізувалась композиція А в нього вводять 440 мл гліцерину в інокулятор через гребінку.

Всі компоненти для приготування 295,1 л поживного середовища наведено в таблиці 6.3.

Таблиця 6.3.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 295,1 л середовища.

Об'єм середовища, яке необхідно нейтралізувати	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 295,1 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
1	2	3	4	5
Середовище М9	0,3 л	88,5	А	200
Ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозид	0,2383	0,0703		
Вода		91,4		
Конденсат 10%		20		
MgSO ₄	0,6	0,17	Б	94,66
US* мікроелементи	1 мл	0,295		
Вода		84,7		
Конденсат 10%		9,46		
Гліцерин	1,5 мл/л	0,44	В	0,44
Σ		295,1		295,1

ДР 3.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 6 м³.

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 3 213,67 л поживного середовища. Враховуючи об'єм посівного матеріалу (292,17 л) від ДР 3.3.

ДР 3.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 0,696 кілограм Ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозид, вводять 876,45 літрів середовище М9 в реактор-змішувач об'ємом 2,5 м³, через об'ємно ваговий дозатор додають 922,85 літрів питної води, вмикають мішалку та подають пару в сорочку до температури 30-40 °С для повного розчинення композиції А. Після чого за допомогою відцентрового насоса (НС-21) перекачують в інокулятор (ІН-6000). Після чого в сорочку

аппарату подають пару до температури 80-90 °С, далі в апарат подають гостру пару до температури 112 °С протягом 30 хв.

ДР 3.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 1,75 кілограмів MgSO₄, набирають 2,9 літрів US* мікроелементів вносять в стерілізатор об'ємом 1,2 м³ (СТ-19), після чого через об'ємно ваговий дозатор додають 820,7 літрів питної води, вмикають мішалку та подають пару в сорочку до температури 30-40 °С для повного розчинення композиції Б. Після чого в сорочку апарату подають пару до температури 80-90 °С, далі в апарат подають гостру пару до температури 131 °С протягом 40 хвилин. Після охолодження простерилізоване поживне середовище перекачують в інокулятор (ІН-6000) за допомогою відцентрового насосу (НС-21).

ДР 3.3.3. Композиції В

Після того, як в ферментері простерилізувалась композиція А вводять 4,38 літри гліцерину в інокулятор через гребінку.

Всі компоненти для приготування 2 921,5 л поживного середовища наведено в таблиці 6.4.

Таблиця 6.4.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 2 921,5 л середовища.

Об'єм середовища, яке необхідно нейтралізувати	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 2 921,5 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
1	2	3	4	5
Середовище М9	0,3 л	876,45	А	2 000
Ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозид	0,2383	0,696		
Вода		922,85		
Конденсат 10%		200		
MgSO ₄	0,6	1,75	Б	917,12
US* мікроелементи	1 мл	2,9		
Вода		820,7		
Конденсат 10%		91,71		

1	2	3	4	5
Гліцерин	1,5 мл/л	4,38	В	4,38
Σ		2 921,5		2 921,5

ДР 3.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 60 м³.

Для виробничого культивування потрібно приготувати необхідно приготувати 31 815,38 л поживного середовища. Враховуючи 2 892,31 л посівного матеріалу (ДР 3.4.)

ДР 3.5.1. Приготування та стерилізації композицій за допомогою УБС-30

Через об'ємно-ваговий дозатор вносять компоненти композиції А у збірник (РЗ-15) подають 11 034,4 літрів питної води і вмикають перемішуючий пристрій.

Поживне середовище за допомогою насоса (Н - 21) надходить в теплообмінник-рекуператор (Т -23), а потім у колонку для стерилізації (К -24), стерилізують при 141 °С, після чого надходить у витримувач (Т - 26). Після витримування поживне середовище надходить в рекуператор пластинчастий (Т -25) для охолодження. Після охолодження стерилізоване поживне середовище самопливом надходить в ферментер (ФР. 60 000) Також в ферментер додається 43,38 літрів гліцерину.

ДР 3.5.2. Композиції Б

2 111,38 л гліцерину додають у вигляді дробного підживлення починаючи на 20 годині культивуванні за допомогою об'ємно-вагового дозатору в гребінку ферментера (ФР. 60 000).

Всі компоненти для приготування 28 923 л поживного середовища наведено у таблиці 6.5.

Таблиця 6.5

Композиції для стерилізації 28 923 л поживного середовища в УБС-30

Об'єм середовища, яке необхідно нейтралізувати	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 28 923 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
1	2	3	4	5
Середовище M9	0,3 л	8 677	А	28 923
Ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозид	0,2383	6,9		
MgSO ₄	0,6	17,3		
Діізононілфталат	0.5 л	4 820,5		
US* мікроелементи	1 мл	28,9 л		
Вода		11 034,4		
Конденсат 15 %		4 338		
Гліцерин	23 мл/л	665,3	Б	665,3
Σ		28 923		28 923

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1. Підготовка колекційної культури *E. coli* BL21

Колекційну культуру *E. coli* BL21 зберігають у пробірках зі скошеним *LB*. Пересіви здійснюють кожні 3-4 місяці і вирощують при температурі 4 °С. Всі роботи з колекційною культурою проводять строго в асептичних умовах.

ТП 4.2. Одержання робочої культури *E. coli* BL21

Колекційну культуру *E. coli* BL21, що зберігалася в пробірках з середовищем *LB*, розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрів із середовищем *LB* і вирощують при температурі 30 °С упродовж 48 годин.

ТП 4.3. Вирощування робочої культури *E. coli* BL21 на середовищі *LB*.

Ізольовані колонії пересівають мікробіологічною петлею в пробірки зі скошеним *LB* та інкубують протягом 48 год.

ТП 4.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалці.

У колбу об'ємом 3 л з композицією А (від ДР 3.1.1) в асептичних умовах вносять композицію Б (ДР 3.1.2), перемішують і розливають стерильним мірним циліндром вносять у 20 колб об'ємом 750 мл. Робочу культуру, яка була вирощена на скошеним *LB*, суспендують клітини, вносять одержану суспензію в колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують суспензію, одержану з однієї пробірки. Культивування *E. coli* BL21 здійснюють на качалці (320 об/хв.) впродовж 24 год. Після вирощування інокуляту здійснюють мікробіологічний контроль в кожній колбі.

Після перевірки посівного матеріалу на відсутність сторонньої мікробіоти в лабораторному боксі посівний матеріал зливають в стерильну засівну колбу об'ємом 4 л.

ТП 4.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 60 літрів

В інокулятор (ІН-60) в якому вже міститься стерильна композиція А (ДР 3.2.1) об'ємом 20 літрів вносять композицію Б (ДР 3.2.2) об'ємом 9,76 літрів і композиція В об'ємом 0,04 літрів (ДР 3.2.3). Посівний матеріал (від ТП 4.4) подають в асептичних умовах через стерильну засівну колбу, об'ємом 4 літрів.

Вмикають мішалку, через засівну колбу вносять посівний матеріал (від ТП 4.4), подають стерильне повітря в барботер, подають пару в рубашку (для підтримання температури 30 °С), та культивують впродовж 24 годин. Кожні 4-6 годин відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 4.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 600 літрів.

У інокулятор (ІН-600), в якому вже міститься простерилізована композиція А (ДР 3.3.1) об'ємом 200 літрів через гребінку вноситься

стерильна композиція Б (ДР 3.3.2) об'ємом 94,66 літр і композиція В об'ємом 0,44 літр (ДР 3.3.3). Після чого через трубу перетискування вноситься посівний матеріал (від ТП 4.5), вмикають мішалку, подають стерильне повітря в барботер, подають пару в рубашку (для підтримання температури 30 °С), та культивують впродовж 24 годин. Кожні 4-6 годин відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 4.7. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 6 м³.

У інокулятор (ІН-6000), в якому вже міститься простерилізована композиція А (ДР 3.4.1) об'ємом 2000 літрів через гребінку вноситься стерильна композиція Б (ДР 3.4.2) об'ємом 917,12 і композиція В (ДР 3.4.3) об'ємом 4,38 літри. Після чого через трубу перетискування вноситься посівний матеріал (від ТП 4.6), вмикають мішалку, подають стерильне повітря в барботер, подають пару в рубашку (для підтримання температури 30 °С), та культивують впродовж 24 годин. Кожні 4-6 годин відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 5. Біосинтез

ТП 5.1. Виробниче культивування

У ферментера (ФР-60 000) вносять простерилізована композицій А від установки УБС-30 (ДР 3.5.1), після чого відбирають пробу для проведення мікробіологічного контролю. Після охолодження поживного середовища додається в ферментер 43,38 літрів гліцерину (ДР 3.5.2).

Посівний матеріал (від ТП 4.7) подають через трубу перетискування з інокулятора (ІН-6000).

Вмикають мішалку, подають стерильне повітря в барботер, подають пару в рубашку та культивують при температурі 30 °С протягом 45 годин. На 20 годині культивування вносять 124,24 л композиції Б у вигляді дробного підживлення і повторюють внесення кожні 5 годин (ДР 3.5.2). Ферментер обладнаний механічним піногасником.

Кожні 4-6 год відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю, та концентрації ароматизатору. В кінці культивування, орієнтовна концентрація ароматизатору лімонену має складати – 2,7 г/л.

ТП 6. Відділення біомаси

ТП 6.1. Центрифугування культуральної рідини.

Після ферментаційного процесу культуральна рідина об'ємом 31 815,38 літрів потрапляє в збірник (З-31) для культуральної рідини, після чого вона надходить на центрифугу ОГШ-2022К-05 (Ц-33) за допомогою відцентрового насосу (НВ-32). Центрифугування проводять при швидкості центрифуги в 8 тисяч.об/хв протягом 1 години. Після центрифугування утворюється 25 000 літрів супернатанту який переходить у збірник (З-34), рідини із збірника переходить на іншу стадію. Утворений осад біомаси об'ємом 6815,38 літри автоматично потрапляє в збірник (З-35) і відводиться на утилізацію (ЗВ-13.3).

ТП 7. Відділення лімонену за допомогою ультрафільтрації

ТП 7.1 Ультрафільтрація для відділення з культуральної рідини високомолекулярних сполук

Після центрифугування супернатант зі збірника в якому знаходиться супернатант (З-34) об'ємом 25 000 літрів за допомогою відцентрового насосу (НВ-32) потрапляє в ультрафільтраційну установку (УУ-25). Супернатант проходить через пори діаметром 10 нм, на яких затримуються всі високомолекулярні компоненти, при цьому тиск ультрафільтраційній установці має бути 0,1 МПа. Після ультрафільтраційної установки утворюється 20 000 літрів пермеату (З-44), який переходить на стадію концентрації.

ТП 8. Концентрування

ТП 8.1. Концентрування за допомогою вакуум-випарного апарату

Після проходження розчином ультрафільтраційної установки розчин який утворився (З-44) переходить на вакуум-випарний апарат (ВВУ-29) для концентрування. Випарювання відбувається до 40% сухих речовин і температурі 50 °С і тиском 0,06 МПа. Випарювання буде проводитися на

протязі 20 години (продуктивність вакуум-випарної установки 2000 л/год). Після концентрування упарений продукт переноситься (З-39) у збірник.

ТП 9. Сушіння продукту

ТП 9.1. Вакуум-випарна шафа

Після вакуум-випарного апарату рідина об'ємом 225 л яка знаходиться в збірнику (З-39) переходить у вакуум-випарну шафу (ВВШ-40) для висушування. Оскільки лімонен це легкозаймиста речовина, висушування потрібно проводити під тиском 0,06 МПа і температурою 50 °С упродовж 2 години.

ТП 10. Подрібнення

ТП 10.1. Подрібнення за допомогою молоткової дробарки

Утворений сухий продукт подрібнюють використовуючи молоткову дробарку. Утворений цільовий продукт в кількості 85,9 кг завантажують в молоткову дробарку (МД-41) установку. Подрібнення відбувається при 14 тис.об/хв протягом 30 хвилин.

ТП 11. Просіювання

Утворений подрібнений продукт вручну завантажують у просіювальну машину фірми Siebtechnik GAS з діаметром пор 1 мм, для цього використовують установку GAS 500 (ПС-42).

ПМВ 12. Фасування, пакування та маркування лімонену.

Подрібнений порошок запаковують в поліетиленовий пакет. Для цього використовують напівавтоматичну пакувальну машину(ПМ-43), яка заповнює, закупорює і маркує пакети об'ємом 1 кг. Продуктивність апарату 20 пакетів на годину. Після чого заповнені первинні упаковки складають у вторинну упаковку, по 6 пакетів в одну вторинну упаковку яку маркують, і відправляють на склад.

ЗВ 13. Знешкодження відходів

ЗВ 13.1. Знешкодження рідких відходів

Вибір конкретної схеми утилізації рідких відходів визначається групою факторів: витратою стічної води, складом і концентрацією забруднень, вимогами до якості очищеної води.

Пропонована схема очищення рідких відходів містить у собі наступні стадії:

1) усереднення та освітлення стічних вод від механічних домішок (усереднювачі, пісковловлювачі, відстійники) – на даному етапі відбувається інтенсивне перемішування стоків з різним якісним і кількісним складом. Перемішування, як правило, здійснюється за рахунок барботажу повітря. У разі потреби в усереднювач також подаються біогенні елементи в потрібних концентраціях і аміачна вода для створення певного значення рН.

2) біологічне очищення освітлених стічних вод (за допомогою біофільтра) – фільтрація здійснюється через шар крупного зернистого матеріалу, покритого біологічної плівкою аеробних мікроорганізмів. Забруднюючі речовини стічних вод сорбуються біоплівкою і, під впливом організмів, з яких вона складається, піддаються процесу окислення. Реакція окислення відбувається в присутності повітря. Для очищення невеликої кількості стічних вод застосовують біофільтри з природною подачею повітря. В якості фільтруючого матеріалу для біофільтрів використовують щєбінь, гальку, керамзит, пластмасові елементи і т.д.

3) доочищення стічних вод – система більш повного біологічного доочищення може складатися з безлічі елементів, що визначаються подальшим призначенням стічної води.

4) обробка осадів – частки мікробної плівки, що відірвалися, після відокремлення їх у вторинному відстійнику не повертаються назад у біофільтр, а спрямовуються на мулові площадки.

Ця схема очистки має перевагу, що можна використовувати при порівняно невеликих об'ємах відходів виробництва та застосування біофільтрів має переваги в тому, що при їх використанні мікроорганізми здатні до практично повного видалення органічних домішок з рідких відходів.

ЗВ 13.2. Знешкодження газоподібних відходів

Відпрацьоване повітря від перевірки апарату на герметичність (ДР 2.6), з інокуляторів (від ТП 4.5,4.6,4.7) та ферментеру (ТП 5.1) відправляють на систему очищення газоповітряних відходів.

13.3. Знешкодження твердих відходів

Вибір методу знешкодження твердих відходів визначаються : кількістю твердих відходів, концентрацією забруднення і вимогами до якості очищення.

Оскільки *E.coli* BL21 це умовний патогенний штам то стерилізацію твердих відходів можна провести таким способом – термічно інактивувати біомасу з подальшою утилізацією.

Розділ 7. Контроль виробництва та виділення та очищення ароматизатору лімонену *Escherichia coli* BL21

Мікробіологічний контроль

Для визначення чистоти культури використовують одночасно два способи: мікроскопіювання та висів на поживні середовища.

Через тривалість отримання результатів методом висіву на щільні поживні середовища чистоту культури здебільшого контролюють мікроскопіюванням. Для цього готують препарат фіксованих забарвлених клітин і розглядають його з імерсією: за допомогою стерильної бактеріологічної петлі чи піпетки наносять на знежирене предметне скло краплю суспензії мікроорганізму. Матеріал рівномірно тонким шаром розподіляють на площі 1–2 см². Після висихання препарат проводять над полум'ям спиртівки для фіксації. На зафіксований препарат наносять 1-2 краплі Генціанвіолету, витримують 1-2 хв. Наносять 1-2 краплі розчину Люголю і витримують протягом 1-2 хв. Для змиву розчину Люголю використовують 70% розчин етилового спирту до відходження барвника, промивають дистильованою водою. Наносять 1-2 краплі фуксину і витримують 3 хв, після чого знову промивають дистильованою водою. Препарат мікроскопіюють з імерсією при збільшенні x90. Клітини *E.coli* BL21 в мікроскопі матимуть рожево-червоне забарвлення, клітини паличкоподібної форми.

Прямі палички, розміром приблизно 1,1-1,5 мкм. Факультативні анаероби, рухомі за рахунок джгутиків. Катабалізують глюкозу і інші вуглеводи[64].

					<i>НУХТ БТЕК 02. 02. 01 КП ПЗ</i>		
<i>Зм</i>	<i>Дрк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розробник</i>		<i>Івасенко М.О.</i>			Розділ 7. Контроль виробництва та виділення та очищення ароматизатору лімонену <i>Escherichia coli</i> BL21		
<i>Керівник</i>		<i>Воронцов О.О.</i>					
<i>Н. контр</i>							
<i>Консульт</i>							
<i>Зав. Каф.</i>		<i>Пирог Т. П.</i>					
					<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
					<i>Кафедра БТМ</i>		

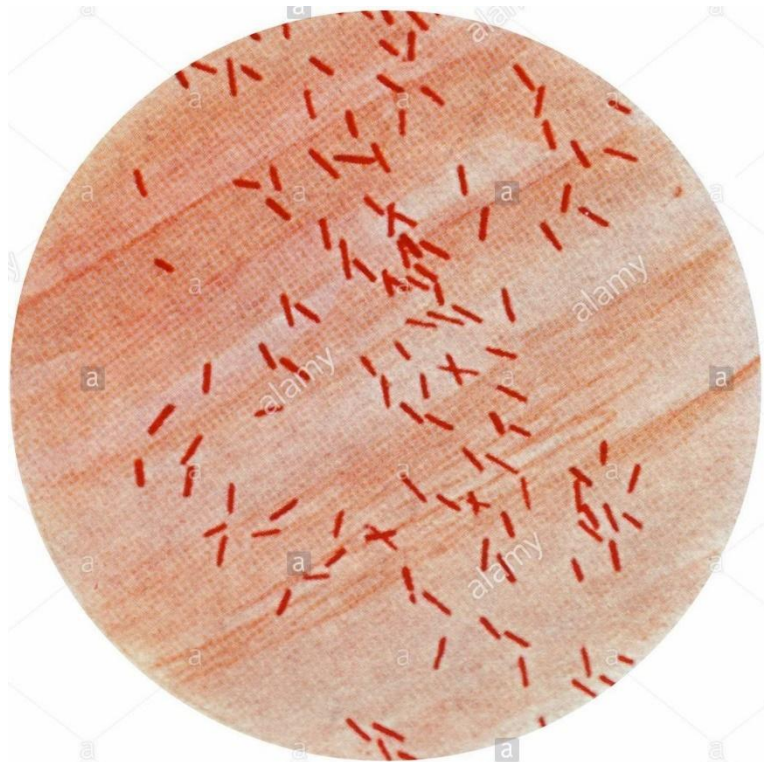


Рис. 6.1. Культури типової культури роду *E.coli* (збільшення $\times 90$)[65]

Визначення концентрації біомаси

У випадку утворення гомогенної суспензії, концентрацію біомаси визначають за оптичною густиною клітинної суспензії із суспензії із наступним перерахунком на абсолютно суху біомасу у відповідності з калібрувальним графіком.

У пробірку із 9 мл дистильованої води вносять по 1 мл культуральної рідини. Суміш збовтується, потім вимірюється оптична густина (при 540 нм). Концентрацію біомаси визначають калібрувальним графіком.

За утворення конгломератів клітин концентрацію біомаси визначають ваговим методом. Для цього відбирають 25 мл культуральної рідини, центрифугують, осад клітин після центрифугування двічі промивають від залишків поживного середовища дистильованою водою. Відмитий осад суспендують у дистильованій воді, переносять у попередньо зважені бюкси і випарюють до постійної маси при 105 °С. Далі перераховують на вміст у г/л[66].

Визначення концентрації лімонену.

Відібрану культуральну рідину центрифугують (20 хв, 4 °С, 4,600 об/хв). Після відділення рідини від біомаси, рідину передають на аналіз який проводять методом газової хроматографії. Концентрацію лімонену визначають за допомогою приладу TRACE GC Ultra або Focus GC (обидва з компанії Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), оснащений полум'яно-іонізаційним детектором і колонкою FactorFour-5ms (30 м, 0,25 мм, 0,25 мкм) (Varian, Inc., Пало-Альто, Каліфорнія, США) і чистий лімонен в якості стандарту (0,2 мМ додекану в якості внутрішнього стандарту). Налаштування наступні: температура інжектора 250°C, безроздільне впорскування або співвідношення поділу 1: 7, молекулярний азот в якості газу-носія. Програма: 80°C (5 хв), 80 - 140°C (7,5°C хв-1), 140 - 300°C (40°C хв-1), 300°C (5 хв).

Оптичну чистоту визначають методом поділу газової хроматографії на приладі Finnigan Focus GC, оснащеному хіральною колонкою Supelco β -DEX 120 (Sigma Aldrich, Steinheim, Німеччина). Програма: 50°C (5 хв), 80 - 140°C (5°C хв-1), 140 - 230°C (40°C хв-1), 230°C (5 хв).

Лімонен і побічні продукти визначають за допомогою газової хромато-мас-спектрометрії з використанням газового хроматографа CP3800, з'єданого з мас-спектрометром 1200 Quadrupole MS (Varian, Inc., Пало-Альто, Каліфорнія, США) з використанням тих же налаштувань, що і вище.

Спектри NMR (протонно ядерний магнітний резонансу) реєструють в хлороформі-d1 за допомогою спектрометра Bruker DRX - 400 (Bruker, Billerica, MA, США) з головкою зразка 5 мм (400,13 МГц)[16].

Визначення концентрації лімонену в готовому продукті

Концентрацію лімонену в готовому продукті визначають за допомогою методу газової хроматографії за допомогою приладу TRACE GC Ultra або Focus GC (обидва з компанії Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), оснащений полум'яно-іонізаційним детектором і колонкою FactorFour-5ms (30 м, 0,25 мм, 0,25 мкм) (Varian, Inc., Пало-Альто, Каліфорнія, США) і чистий

лімонен в якості стандарту (0,2 мм додекан в якості внутрішнього стандарту). Налаштування наступні: температура інжектора 250°C, безроздільне впорскування або співвідношення поділу 1: 7, молекулярний азот в якості газу-носія. Програма: 80°C (5 хв), 80 - 140°C (7,5°C хв-1), 140 - 300°C (40°C хв-1), 300°C (5 хв).

Оптичну чистоту визначали методом поділу газової хроматографії на приладі Finnigan Focus GC, оснащеному хіральною колонкою Supelco β -DEX 120 (Sigma Aldrich, Steinheim, Німеччина). Програма: 50°C (5 хв), 80 - 140°C (5°C хв-1), 140 - 230°C (40°C 1 хв), 230°C (5 хв)[16].

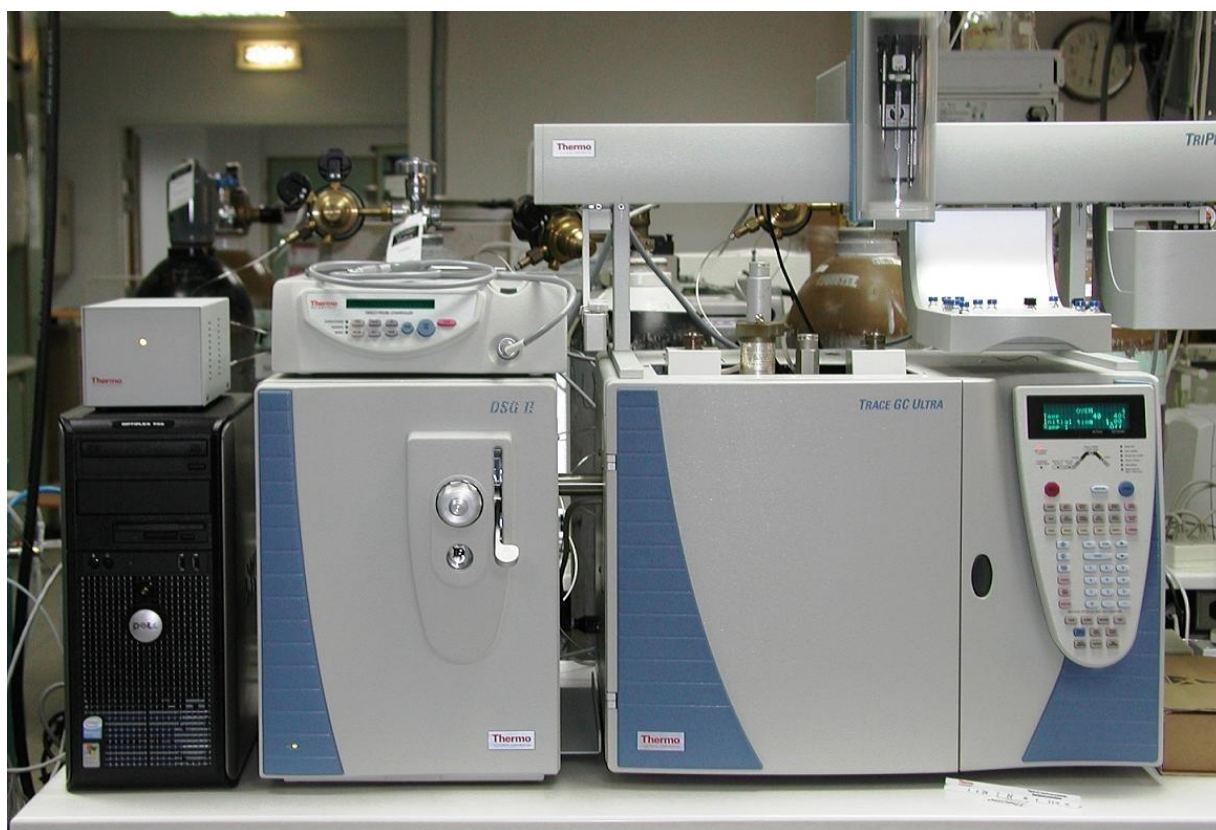


Рис 6.2. Газовий хроматограф TRACE GC Ultra

Визначення концентрації вуглецю в культуральній рідині (глюкози і гліцерину)

Культуральну рідину у кількості 50 мл відбирають з ферментера, переносять у центрифужні пробірки та центрифугують при 1500 об/хв 15-20 хв, далі відцентрифуговану суспензію піддають гідролізу додаючи до неї еквівалентну кількість соляної кислоти (1:1). Витримують у термостаті при температурі 90 °С протягом 15 хвилин. Після цього гідролізат випарюють під витяжкою на водяній бані для випаровування соляної кислоти. Після цього одержаний гідролізат фільтрують через фільтрувальний папір, фільтрат відбирають у окрему ємність для аналізів.

Відбирається певний об'єм проби, його розводять у 250-1000 разів, далі від розведеного розчину відбирають 5-10 мл і переносять у 20 мл 20 мМ буферного розчину системи: KH_2PO_4 — Na_2HPO_4 з рН 7.2. До даної системи додають глюкозооксидазу іммобілізовану на полімері ЕДТ (20 мМ фосфатному буфері, рН 6,2, яка складалася з 10–2 М 3,4-етилендіокситіофену, 10–3 М поліетиленгліколю та 30 мг/мл розчину ГОД) у вигляді суспензії.

Вимірювання концентрації глюкози здійснюється за допомогою амперометричного перетворювального приладу, що складається з традиційної триелектродної системи, в якій друкований електрод SensLab (SensLab GmbH, Leipzig, Німеччина) поєднав у собі всі три електроди: платиновий робочий, допоміжний та електрод порівняння. Платинові друковані електроди SensLab досліджували на відтворюваність та працездатність у діапазоні потенціалу від 0 до + 600 мВ. Вимірювання проводять опусканням датчика амперометричного приладу у розчин-систему з глюкозооксидазою та підготовленою культуральною рідиною.

Концентрацію глюкози визначають за градуовальним графіком залежності сили струму (нА) і концентрації глюкози (мМ). Одержане значення концентрації спочатку перемножують на ступінь розведення, а потім

переводять концентрацію з мМ у г у певному об'ємі чи г/л Вміст карбону у глюкозі 40 %, тобто 1 г глюкози відповідає 0,4 г карбону.

Гліцерин визначається шляхом об'єднання реакції Малапрейда і реакції Ханца. Ці реакції засновані на реакції Малапрада, є найбільш широко використовуваними для виявлення 1,2-діолів або споріднених сполук, включаючи гліцерин. У цій реакції гліцерин перетворюється у формальдегід. Потім для визначення формальдегіду використовується реакція Ханца. У цій реакції ацетилацетон і аміак використовуються для утворення барвника в з'єднанні з формальдегідом. Цей барвник являє собою 3,5-діацетил-1,4-дигідролутидин (DDL), який може бути виміряний при 410 Нм при використанні спектрофотометрії. Аналіз може бути виконаний в стандартному спектрофотометрі або зчитувачі мікропланшетів. Використання зчитувача мікропланшетів має ту перевагу, що відразу можна виміряти кілька зразків (наприклад, 96 або 384, в залежності від свердловинної пластини).

Визначення концентрації гліцерину проводять за допомогою Н-ЯМР спектроскопії.

Для цього в мікрокювету об'ємом 2 мл переносять 0,05 мл досліджуваного розчину. Додають 0,6 мл дистильованої води. Розчин перемішують і переливають в ампулу для зйомки спектрів ЯМР. Спектр отримують при наступних параметрах, що дозволяють до наступного імпульсу системі ядер прийти в термічне рівновагу: час відгуку - 5 сек; довжина радіочастотного імпульсу - 3,3 мксек (10 град.); релаксационная затримка - 10 сек; кількість накопичень - 16.

Інтегрування сигналів виробляють в наступних областях:

1. 3,4 - 3,8 М.Д. - сигнали протонів метиленових і метанової груп гліцерину;
2. 4,6 - 4,9 М.Д. - сигнал протонів води.

Мас процентний вміст компонентів в суміші визначають за формулою:

$$I_1=I_1/5; I_2=(I_2-0,6\times I_1)/2.$$

I1,12 и I'1, I'2- значения измеренных и приведенных интегралов сигнала протонов метиленовых и метановой групп глицерина и сигнала протонов воды соответственно[67].

Концентрація амінного азоту.

Основним джерелом азоту в середовищі для культивування E.coli BL21 є NH_4Cl який знаходиться в середовищі M9. Його вміст визначають методом Несслера.

Метод заснований на здатності аміаку (вільний аміак і іони амонію) утворювати з лужним розчином йодиду одновалентної ртуті пофарбовані в жовтий колір сполуки йодиду меркураммонію. При низькій концентрації аміаку та іонів амонію отримують колоїдний розчин, придатний до колориметрування. При великому вмісті (> 3 мг / л) випадає бурий осад, в цьому випадку визначення необхідно проводити після розведення проби безаміачною водою.

Хід виконання:

У колбу поміщають 50 мл досліджуваної проби, доливають 1 мл 50% сегнетової солі і 1 мл реактиву Несслера, перемішують. Через 10 хвилин вимірюють на фотоелектроколориметрі в кюветах з товщиною оптичного шару 2 см (довжина хвилі - 425 нм) по відношенню до безаміачної води, в яку додані відповідні реактиви. Забарвлення стійке 1 годину. Зміст іонів амонію (мг) знаходять за калібрувальним графіком або візуально порівнюючи інтенсивності забарвлення проби і шкали стандартних розчинів, приготованих одночасно[68].

Визначення вологості висушеного порошку

Після того як концентрований розчин з готовим продуктом пройшов вакуум-випарну шафу потрібно перевірити його вологість. Для вимірювання вологості готового порошку доцільно застосовувати кондуктометричний спосіб. Для цього використовують аналізатор вологості лабораторний OHAUS MB25.

Методика проведення:

Висушений продукт попередньо зважують, після чого йде нагрів утвореного продукту в апараті, при закінченні висушування сухий продукт зважують і визначають втрату вологи [63].



Рис. 6.3. Аналізатор вологості лабораторний OHAUS MB25

Карту постадійного контролю виробництва ароматизатору лімонену *E. coli* BL21 наведено у таблиці 7.1.

Таблиця 7.1

Карта постадійного контролю біосинтезу ароматизатору лімонену

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
ДР 1. Санітарна підготовка виробництва				
ДР 2. Підготовка аераційного повітря				
Кт 2.2. Грубе очищення повітря	Повітря на виході з фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 80 %, тиск згідно паспорту
Кт 2.3 Компресування повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	P = 0,4 МПа t = 120-250 °C
Кт 2.4 Охолодження повітря та видалення зайвої вологи	Охолоджене повітря, повітря після видалення зайвої вологи, температура	Термометр технічний, психометричний метод	Після охолодження повітря та видалення зайвої вологи	t = 30 °C, W = 60 %
Кт 2.5 Нагрівання повітря	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	t = 40 °C

Продовження таблиці 7.1

1	2	3	4	5
Кт 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі головного очищення	E = 95 %, тиск згідно паспорту
Кт 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря в індивідуальному фільтрі	E = 99,999 %
ДР 3.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту об'ємом 3 л в колбах на качалках				
Кт, Км 3.1.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=130 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, t=112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
ДР 3.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 60 л				
Кт, Км 3.2.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, t=112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
ДР 3.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 600 л				

Продовження таблиці 7.1

1	2	3	4	5
Кт, Км 3.3.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, t=112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
ДР 3.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 6000 л				
Кт, Км 3.4.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, t=112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
ДР 3.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 60 м³				
Кт, Км 3.5.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиції А, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, t=141 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
ТП 4. Підготовка посівного матеріалу				

Продовження таблиці 7.1

1	2	3	4	5
Кт, Км 4.4 Вирощування інокуляту в колбах на качалках	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси	Термометр технічний, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль	Після вирощування культури в колбах на качалках	$t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24$ год, $n = 320$ об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 4.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 60 л	Посівний матеріал, швидкість перемішування, тривалість культивування, рН, температура, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, датчик рН, годинник, мікробіологічний контроль	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі і в кінці процесу	$\tau = 24$ год, $t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7,2$, $n = 250$ об/хв, аерація – 1 об/об×хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 4.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 600 л	Посівний матеріал, швидкість перемішування, тривалість культивування, рН, температура, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, датчик рН, годинник, мікробіологічний контроль	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі і в кінці процесу	$\tau = 24$ год, $t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7,2$, $n = 250$ об/хв, аерація – 1 об/об×хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 4.7. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 6000 л	Посівний матеріал, швидкість перемішування, тривалість культивування, рН, температура, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, датчик рН, годинник, мікробіологічний контроль	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі і в кінці процесу	$\tau = 24$ год, $t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7,2$, $n = 250$ об/хв, аерація – 1 об/об×хв, відсутність сторонньої мікробіоти

Продовження таблиці 7.1

1	2	3	4	5
ТП 5. Виробничий біосинтез				
Кт, Км, Кх 5.1 Виробниче культивування	Культуральна рідина, швидкість перемішування, температура, рН, тривалість культивування, мікробіологічна чистота культури, концентрація ароматизатору лімонену	Термометр технічний, годинник, датчик рН, фотоелектроколориметр, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль та визначення рівня біомаси проводять кожні 4-6 годин, концентрація ароматизатору визначається після закінчення процесу культивування	t = 30 °С, τ = 45 год, рН =7,2, n =250 об/хв, аерація – 1 об/об×хв, відсутність сторонньої мікробіоти, концентрація лімонену=2,7 г/л
ТП 6. Відділення біомаси				
Кт 6. Центрифуга	Частота обертів, тривалість процесу	Тахометр, годинник	Частота обертів перевіряється безпосередньо перед під час процесу	τ = 60 хв, n = 8000 об/хв
ТП 7. Ультрафільтрація				
Кт 7. Ультрафільтрація	Тиск	Барометр	Тиск контролюється безпосередньо під час проходження процесу	p=0,1 Мпа; d=10 нм
ТП 8. Концентрування				
Кт 8. Концентрування Вакуум-випарний апарат	Тиск, температура, час	Термометр, барометр, годинник	Тиск та температура контролюється безпосередньо під час проходження процесу	P=0,006 Мпа; t=50 °С; τ = 20 години; C=40%.
ТП 9. Сушіння продукту				

Закінчення таблиці 7.1

Кт 9. Вакуум-випарна шафа	Тиск, температура, температура	Термометр, барометр, годинник	Тиск , температура та час контролюється безпосередньо під час проходження процесу	$P=0,006$ Па; $t= 50$ °С; $\tau = 2$ години.
ТП 10. Подрібнення				
Кт 10. Подрібнення висушеного продукту	Частота обертів, тривалість процесу	Тахометр, годинник	Частота обертів перевіряється безпосередньо перед під час процесу	$\tau = 30$ хв, $n = 14000$ об/хв
ТП 12. Фасування, пакування та маркування лімонену.				
Кт 11. Пакування та фасування продукту	Цілісність пакету	Візуально	Перевірка пакету на герметичність	Кількісне

Висновок

1. В результаті аналізу літературних джерел, виявили, що проблема отримання ароматичних сполук альтернативними методами є актуальною. Отримання лімонену як ароматичної речовини яку будуть використовувати в харчовій промисловості за допомогою біосинтезу *Escherichia coli* є перспективною.

2. На основі аналізу літературних даних в якості продуцента було обрано *E.coli* BL21 в якості продуцента, оскільки даний продуцент характеризується найбільшим виходом цільового продукту – 2,7 г/л та відносно дешевим поживним середовищем.

3. Для отримання лімонену був обраний періодичний глибиний спосіб культивування *E. coli* BL21 з підживленням при температурі 30 °С, рН 7,2 протягом 45 годин. Середовища для отримання інокулятор складається з 3 композицій. Отримання інокуляту відбувається в 4 етапи: підготовка посівного матеріалу в колбах на качалках та в інокуляторах об'ємом 60, 600, 6 м³. Середовище для виробничого культивування складається з 2 композиції. За цикл отримується 31815 літр культуральної рідини.

Список використаної літератури:

1. Azwanida N.N. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Med Aromat Plants*. 2015; 4: 196. doi:10.4172/2167-04112.1000196
2. Wei, L., Zhang, W., Yin, L., Yan, F., Xu, Y., & Chen, F. Extraction optimization of total triterpenoids from *Jatropha curcas* leaves using response surface methodology and evaluations of their antimicrobial and antioxidant capacities. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2015; 18: 88–95. doi:10.1016/j.ejbt.2014.12.005
3. Vongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y., & Gritsanapan, W. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Industrial Crops and Products*. 2013; 44: 566–571. doi:10.1016/j.indcrop.2012.09.021
4. Paulucci, V. P., Couto, R. O., Teixeira, C. C. C., & Freitas, L. A. P. Optimization of the extraction of curcumin from *Curcuma longa* rhizomes. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2013; 23(1): 94–100. doi:10.1590/s0102-695x2012005000117
5. Oancea, S., Stoia, M., & Coman, D. Effects of Extraction Conditions on Bioactive Anthocyanin Content of *Vaccinium Corymbosum* in the Perspective of Food Applications. *Procedia Engineering*. 2012; 42: 489–495. doi:10.1016/j.proeng.2012.07.440
6. Vankar, P. S., & Srivastava, J. Evaluation of Anthocyanin Content in Red and Blue Flowers. *International Journal of Food Engineering*, 2010, 6(4). doi:10.2202/1556-3758.1907
7. R.G. Berger. Flavours and Frances//Chemistry, Bioprocessing and Sustainability. *Library of Congress Control Number*: 2006;93:9012
DOI 10.1007/b136889

8. Carroll, A. L., Desai, S. H., & Atsumi, S. Microbial production of scent and flavor compounds. *Current Opinion in Biotechnology*. 2016; 37: 8–15. doi:10.1016/j.copbio.2015.09.003
9. Ароматизаторы предназначены для придания пищевым продуктам вкуса и аромата и для усиления имеющегося вкуса и аромата [Электронный ресурс] // Режим доступа:
http://newchemistry.ru/letter.php?n_id=6764
10. O V Ardashov, K P Volcho, N F Salakhutdinov, "Synthesis of hydroxy derivatives of limonene". *RUSS CHEM REV.*2014; 83 (4): 281–298
DOI: <https://doi.org/10.1070/RC2014v083n04ABEH004383>
11. Ni J., Tao F., Du H., Xu P. Mimicking a natural pathway for de novo biosynthesis: natural vanillin production from accessible carbon sources. *Scientific Reports.*2015; 5: 13670.
DOI: 10.1038/srep13670
12. Peng Chen, Lei Yan, Zhengrong Wu, Suyue Li, Zhongtian Bai, Xiaojuan Yan, Ningbo Wang, Ning Liang, Hongyu Li. A microbial transformation using *Bacillus subtilis* B7-S to produce natural vanillin from ferulic acid.*Scientific reports*. 2016 ; 04 February.
<https://doi.org/10.1038/srep20400>
13. Adelaide B., Guerreiro C., Belo I. Generation of Flavors and Fragrances Through Biotransformation and De Novo Synthesis.*Springer Nature*. 2018.
<https://doi.org/10.1007/s11947-018-2180-8>
14. Cao X., Lv Y.-B., Chen J., Imanaka T., We, L.-J., Hua Q. Metabolic engineering of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for limonene overproduction. *Biotechnology for Biofuels*. 2016; 9: 214.
<https://doi.org/10.1186/s13068-016-0626-7>
15. Davies, F. K., Work, V. H., Beliaev, A. S., & Posewitz, M. C. Engineering Limonene and Bisabolene Production in Wild Type and a Glycogen-Deficient Mutant of *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2014; 2.

doi:10.3389/fbioe.2014.00021

16. Christian Willrodt, Christian David, Sjef Cornelissen, Bruno Bühler, Mattijs K. Julsing and Andreas Schmid. Engineering the productivity of recombinant *Escherichia coli* for limonene formation from glycerol in minimal media. *Biotechnol J.* 2014; Aug;9(8):1000-12.

doi: 10.1002/biot.201400023.

17. Willrodt, C., Halan, B., Karthaus, L., Rehdorf, J., Julsing, M. K., Buehler, K., & Schmid, A. Continuous multistep synthesis of perillic acid from limonene by catalytic biofilms under segmented flow. *Biotechnology and Bioengineering.* 2016;114(2): 281–290.

doi:10.1002/bit.26071

18. Etschmann, M., Bluemke, W., Sell, D., & Schrader, J. Biotechnological production of 2-phenylethanol. *Applied Microbiology Biotechnology.* 2002; 59: 1–8.

<https://doi.org/10.1007/s00253-002-0992-x>.

19. Kang, Z., Zhang, C., Du, G., & Chen, J. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of 2-phenylethanol from renewable glucose. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 2014; 172: 2012–2021.

<https://doi.org/10.1007/s12010-013-0659-3>.

20. Guo, D., Zhang, L., Pan, H., & Li, X. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of 2-Phenylethylacetate from L-phenylalanine. *Microbiologyopen.* 2017; 1–5.

<https://doi.org/10.1002/mbo3.486>.

21. Hua D., Xu P. Recent advances in biotechnological production of 2-phenylethanol. *Biotechnology Advances.* 2011; 29: 654–660.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.001>

22. Etschmann M., Sell D. and Schrader J.. Medium optimization for the production of the aroma compound 2-phenylethanol using a genetic algorithm. *Journal of Molecular Catalysis B. Enzymatic.* 2004; 29: 187-193.

<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2003.10.014>

23. Celinska E., Kubiak P., Bialas W., Dziadas M., Grajek W. *Yarrowia lipolytica*: the novel and promising 2-phenylethanol producer//*Journal Industrial Microbiology Biotechnology*. 2013; 40: 389– 392.
DOI: 10.1007/s10295-013-1240-3
24. Kim B., Cho B. R., Hahn J. S. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of 2-phenylethanol via Ehrlich pathway. *Biotechnoogy Bioengineering*. 2014; 111: 115–124.
DOI: 10.1002/bit.24993/
25. Gallage, N. J., Hansen, E. H., Kannangara, R., Olsen, C. E., Motawia, M. S., Jørgensen, K., ... Møller, B. L. Vanillin formation from ferulic acid in *Vanilla planifolia* is catalysed by a single enzyme. *Nature Communications*. 2014; 5(1).
<https://doi.org/10.1038/ncomms5037>
26. Schrader J., Etschmann M, Sell D., J-M Hilmer and Rabenhorst J. Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavor compounds- current industrial processes and future prospects. *Biotechnology Letters*. 2004; 26: 463-472.
<https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000019576.80594.0e>
27. Braga, A., Crutz-Le Coq, A. M., Dulermo, R., Nicaud, J. M., & Belo, I. Effect of POX genotype and Lip2p overexpression on lactone production and reconsumption by *Yarrowia lipolytica* using castor oil as substrate. *Process Biochemistry*. 2015; 50(9): 1357–1362.
doi:10.1016/j.procbio.2015.05.019
28. Hansen EH, Møller BL, Kock GR, et al.: De novo biosynthesis of vanillin in fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) and baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Applied and environmental microbiology*. 2010; 75: 2765-74.
DOI:10.1128/AEM.02681-08.
29. Ana Rita Brochado, Claudia Matos, Birger L Møller, Jørgen Hansen, Uffe H Mortensen, Kiran Raosaheb Patil. Improved vanillin production in baker's yeast through in silico design. *Microbial Cell Factories*. 2010; Article number: 84. 08.
<https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-84>

30. Longo, M. A., & Sanromán, M. A. Production of food aroma compounds: microbial and enzymatic methodologies. *Food Technology and Biotechnology*. 2006; 44: 335–353.
31. Waché, Y., Aguedo, M., LeDall, M. T., Nicaud, J. M., & Belin, J. M. Optimization of *Yarrowia lipolytica*'s β -oxidation pathway for γ -decalactone production. *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*. 2002; 347–351. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(02\)00185-6](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(02)00185-6).
32. Gomes N., Adelaida Braga A., Teixeira J., Belo I.. Impact of lipase-Mediated Hydrolysis of Castor Oil on γ -Decalactone Production by *Yarrowia lipolytica*. *J Am Oil Chem Soc*. 2013; 90: 1131-1137. <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-013-2269-1>.
33. Nelma G., Braga A., Jose T., Isabel B. Impact of Lipase-Mediated Hydrolysis of Castrol Oil on γ -Decalactone Production by *Yarrowia lipolytica*. *J Am Oil Chem Soc*. 2013; 90:1131-1137. <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-013-2269-1>.
34. Soares G., Souza K., Vilela L., Schwan R. and Dias D. γ -deltalactone production by *Yarrowia lipolytica* and *Lindnera Saturnus* in crude glycerol. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 2017; 47:6: 633-637. DOI: 10.1080/10826068.2017.1286601
35. Soares G., Souza K., Vilela L., Schwan R. and Dias D. γ -deltalactone production by *Yarrowia lipolytica* and *Lindnera Saturnus* in crude glycerol. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 2017; 47:6: 633-637. DOI: 10.1080/10826068.2017.1286601
36. Kim, S.-J., Kim, J.-W., Lee, Y.-G., Park, Y.-C., & Seo, J.-H. (2017). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for 2,3-butanediol production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2017; 101(6):2241–2250. doi:10.1007/s00253-017-8172-
37. Dias, B. do C., Lima, M. E. do N. V., Vollú, R. E., da Mota, F. F., da Silva, A. J. R., de Castro, A. M. Seldin, L. 2,3-Butanediol production by the non-pathogenic

bacterium *Paenibacillus brasiliensis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018; 102: 8773–8782.

doi:10.1007/s00253-018-9312-y

38. Li, W., Pu, N., Liu, C.-X., Yuan, Q.-P., & Li, Z.-J. Metabolic engineering of the marine bacteria *Neptunomonas concharum* for the production of acetoin and meso-2,3-butanediol from acetate. *Biochemical Engineering Journal*. 2019; 66(16): 3998-4006

doi:10.1016/j.bej.2019.107311

39. Choi EJ, Kim JW, Kim SJ, Seo SO, Lane S, Park YC, Jin YS, Seo JH(2016) Enhanced production of 2,3-butanediol in pyruvate decarboxylase-deficient *Saccharomyces cerevisiae* through optimizing ratio of glucose/galactose. *Biotechnol J*. 2016; 11(11): 1424–1432.

doi:10.1002/biot.201600042

40. Lian JZ, Chao R, Zhao HM. Metabolic engineering of a *Saccharomyces cerevisiae* strain capable of simultaneously utilizing glucose and galactose to produce enantiopure (2R,3R)-butanediol. *Metab Eng* . 2014; 23: 92–99.

doi:10.1016/j.ymben.2014.02.003

41. Lee HJ, Kim SJ, Yoon JJ, Kim KH, Seo JH, Park YC. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient conversion of red algal biosugars to bioethanol. *Bioresour Technol*. 2015; 191: 445–451.

doi:10.1016/j.biortech.2015.03.057

42. Kim J W, Kim J, Seo S O, Kim K H, Jin Y S, Seo J H. Enhanced production of 2, 3-butanediol by engineered *Saccharomyces cerevisiae* through fine-tuning of pyruvate decarboxylase and HADH oxidase activities. *Biotechnol Biofuels*. 2016; 9(1): 265.

doi:10.1186/s13068-016-0677-9

43. Kim JW, Seo SO, Zhang GC, Jin YS, Seo JH. Expression of *Lactococcus lactis* HADH oxidase increases 2, 3-butanediol production in Pdc-deficient *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour Technol*. 2015; 191: 512–519.

doi:10.1016/j.biortech.2015.02.077

44. Schrader J., Etschmann M.M.W. and at. Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds – current industrial processes and future prospects. *Biotechnology Letters*. 2004; 26: 463–472.
<https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000019576.80594.0e>
45. Adelaide B., Guerreiro C., Belo I. Generation of Flavors and Fragrances Through Biotransformation and De Novo Synthesis. *Springer Nature*. 2018
<https://doi.org/10.1007/s11947-018-2180-8>
46. Brochado, A.R., Matos, C., Møller, B.L. et al. Improved vanillin production in baker's yeast through in silico design. *Microb Cell Fact*. 2010; 9: 84.
<https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-84>
47. Charu Gupta, Dhan Prakash and Sneh Gupta. A Biotechnological Approach to Microbial Based Perfumes and Flavours. *Journal of Microbiology & Experimentation*. Volume 2 Issue 1 – 2015.
DOI: 10.15406/ jmen.2015.01.00034
48. Romero-Guido C, Belo I, Ta TM, Cao-Hoang L, Alchihab M et al. Biochemistry of lactone formation in yeast and fungi and its utilization for the production of flavour and fragrance compounds. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011; 89(3): 535-547.
DOI: 10.1007/s00253-010-2945-0
49. Global 2,3 Butanediol Market 2020 : Industry Outlook, Top Countries Data, Market Size, Driving Factors by Manufacturers, Growth and Forecast 2026 [Электронный ресурс] // Режим доступа:
<https://www.marketwatch.com/press-release/global-23-butanediol-market-2020-industry-outlook-top-countries-data-market-size-driving-factors-by-manufacturers-growth-and-forecast-2026-2020-03-11>
50. Martínez-Avila, O., Sánchez, A., Font, X. et al. Bioprocesses for 2-phenylethanol and 2-phenylethyl acetate production: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018; 102: 9991–10004.
<https://doi.org/10.1007/s00253-018-9384-8>

51. The Freedonia Group — The First Choice In Industry Research [Електронний ресурс]//Режим доступу:

<https://www.freedoniagroup.com/Flavors-And-Fragrances.html> /.

52. Шелавина Е. Исследования компании «Файн Ингредиентс»: Тенденции мирового иотечественного рынка ароматизаторов. Погружаясь в ароматы мира. URL: <http://chinru.com/rynok-aromatizatorov/>

53. Державна служба статистики України, офіційний веб-сайт [Електронний ресурс]//Режим доступу:

<http://www.ukrstat.gov.ua/>

54. Устойчивое развитие корпорации «Оболонь» [Електронний ресурс]//Режим доступу:

http://report.obolon.ua/ru/production/production_facilities/

55. Обзор украинского рынка безалкогольных напитков 2017-2018 [Електронний ресурс]//Режим доступу:

https://trademaster.ua/ryinki_food/312974

56. CFR - Code of Federal Regulations Title 21 [Електронний ресурс]//Режим доступу:

<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=501.22>

57. "Про ароматизатори та деякі харчові інгредієнти із ароматизованими властивостями, що застосовується в та на продуктах харчування, та що вносить зміни до Регламенту Ради (ЄЕС) N 1601/91, Регламентів (ЄС) N 2232/96 і (ЄС) N 110/2008 та Директиви 2000/13/ЄС" [Електронний ресурс]//Режим доступу:

https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/994_a20

58. Грачева И. М. Технология ферментных препаратов. –М.: Пищевая промышленность, 1975. – 391 с.

59. FDA. (2013). A food labeling guide. US Food Drug Administration, 132.

60. Сидоров Ю.І., Влязло Р.Й., Новіков В.П. Процеси і апарати мікробіологічної та фармацевтичної промисловості. Технологічні розрахунки.

Приклади і задачі. Основи проектування: Навчальний посібник.- Львів. «Інтелект-Захід», 2008,-736 с.

61. Пирог Т.П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія : Підручник. – Київ: НУХТ,2009. 336 с.

62. Криогенный метод. [Електронний режим доступу]//Режим доступу:
<http://www.xiron.ru/content/view/31145/28/>

63. Аналізатор вмісту вологості ОНАУС МВ 25 [Електронний режим доступу]//Режим доступу:

<https://simvolt.ua/analzator-vologost-laboratorniy-galogenni-ohaus-mb25.html/>

64. *E.coli* under the Microscope [Електронний ресурс]//Режим доступу:

<https://www.microscopemaster.com/e-coli-under-microscope.html>

65. [Електронний ресурс]//Режим доступу:

https://www.researchgate.net/figure/Gram-stain-of-E-coli-bacterium-A-gram-stain-of-shows-gramnegative-bacilli-in-an_fig4_319130632

66. Коломиец Э.И., Лобанок А.Г. Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. – М.: Беларуская навука, 2015. – 198 с

67. Одновременное количественное определение глицерина и ацетата калия в водном растворе методом н ямр спектроскопии [Електронний ресурс]//Режим доступу:

<https://edrid.ru/rid/219.017.734e.html>

68. Пименова, Е.В. Химические методы анализа в мониторинге водных объектов//Пермь: Изд-во ФГБОУ ВПО Пермская ГСХА, 2011.-138с.-100 экз.