

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»  
Директор інституту(декан  
факультету)

\_\_\_\_\_ Грегірчак Н.М.  
(підпис) (прізвище та ініціали)

«\_\_\_\_\_» червень 2021 р.

«До захисту допущено»  
Завідувач кафедри

\_\_\_\_\_ Пирог Т.П.  
(підпис) (прізвище та ініціали)

«\_\_\_\_\_» червень  
2021 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**  
**НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**  
зі спеціальності \_\_\_\_\_ 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної  
програми «Біотехнологія»  
на тему: Біосинтез лікопіну *Blakeslea trispora*

Виконав: здобувач 4 курсу, групи 2

\_\_\_\_\_ Гордаш Дар'я Юріївна \_\_\_\_\_  
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник Пенчук Юрій Миколайович \_\_\_\_\_  
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти Клименко О.М. \_\_\_\_\_  
(прізвище та ініціали) (підпис)

\_\_\_\_\_ (прізвище та ініціали) \_\_\_\_\_ (підпис)

\_\_\_\_\_ (прізвище та ініціали) \_\_\_\_\_ (підпис)

Рецензент Костюк О. С. \_\_\_\_\_  
(прізвище та ініціали) (підпис)

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

Здобувач \_\_\_\_\_  
(підпис)

Київ – 2021 р.

# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біотехнологія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнологія»

(назва)

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Пирог Т.П.

“ 01 ” квітня 2021 року

## ЗАВДАННЯ

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Гордаш Дар'я Юріївна

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез лікопіну *Blakeslea trispora*

керівник роботи Пенчук Юрій Миколайович доц.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 30 березня 2021 року № 228-кв

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

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Blakeslea trispora*, цільовий продукт Лікопін

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) \_\_\_\_\_

РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми. РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми. РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва РОЗДІЛ 9. Автоматизація ділянки виробництва. РОЗДІЛ 10. Охорона довкілля

5. Перелік графічного матеріалу \_\_\_\_\_

Технологічна схема виробництва лікопіну – 2 аркуші А3. Апаратурна схема виробництва лікопіну – 2 аркуші формату А1 та А3. Схема автоматизації ділянки відділення біомаси 1 аркуш формату А3

6. Консультанти розділів роботи \_\_\_\_\_

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 9. Автоматизація	Клименко О.М., доцент, к.т.н., кафедра автоматизації та комп'ютерних технологій систем управління		

7. Дата видачі завдання 01 квітня 2021 року

### КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукта	01.04.21-04.04.21	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	05.04.21-11.04.21	
3	Техніко-економічне обґрунтування	12.04.21-18.04.21	
4	Біосинтез цільового продукту	19.04.21-22.04.21	
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми	23.04.21-27.05.21	
6	Специфікація обладнання	28.04.21-31.04.21	
7	Опис технологічної схем	01.05.21-08.05.21	
8	Контроль виробництва	09.05.21-13.05.21	
9	Автоматизація ділянки виробництва	14.05.21-18.05.21	
10	Охорона довкілля	19.05.21-23.05.21	
11	Оформлення пояснювальної записки	24.05.21-28.05.21	
12	Виконання графічної частини проекту	01.05.21-25.05.21	

**Здобувач**

\_\_\_\_\_ (підпис)

Гордаш Д. Ю.

(прізвище та ініціали)

**Керівник роботи**

\_\_\_\_\_ (підпис)

Пенчук Ю. М.

(прізвище та ініціали)

## РЕФЕРАТ

Представлено проект виробництва лікопіну у вигляді сухих кристалів, продуцентом якого є гетероталічний гриб *Blakeslea trispora* NRRL 2895 (+) та *Blakeslea trispora* I5 (-), який синтезує на середовищі з крохмалем 1,3 г/л цільового продукту. Лікопін - це каротиноїд, що має загальнозміцнювальну дію на організм, стабілізує імунний статус організму, поліпшує протікання ряду найважливіших біологічних процесів в організмі, в тому числі нормалізує рівень глюкози в крові, ліпідний обмін, зір і контролює проліферацію (новоутворення) клітин. Розрахована потужність його виробництва становить 153 м<sup>3</sup> культуральної рідини або 199 кг кристалів лікопіну на рік.

Технологія виробництва лікопіну включає допоміжні роботи (приготування мийних засобів, підготовка аераційного повітря, приготування та стерилізація поживного середовища, розчин гідроксиду калія та соляної кислоти) та сам технологічний процес (вирощування інокуляту в колбах на качалках, інокуляторах та сам біосинтез, відділення біомаси, сушіння біомаси, екстрація лікопіну етилацетатом, вирарювання екстракту, кристалізація, фільтрація кристалів, промивання кристалів, висушування кристалів лікопіну), що наведені в технологічній та апаратурній схемах .

Дипломний проект викладений на 140 сторінок друкованого тексту, містить 20 таблиць, 16 рисунків і складається зі вступу, 10 розділів, списку використаної літератури (84 джерела), додатків та графічної частини (1 креслення формату А1, 4 креслення формату А3).

**Ключові слова:** лікопін, *Blakeslea trispora* NRRL 2895 (+), *Blakeslea trispora* I5 (-), каротиноїди, біосинтез, фільтрація, екстракція, кристалізація, виділення, очищення.

## ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	4
ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту.....	9
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента.....	12
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	12
2.2. Розрахунок складу поживного середовища.....	17
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	19
2.4. Таксономічний статус біологічного агента.....	21
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	22
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	22
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	23
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	26
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	27
РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту.....	32
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента.....	32
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.....	34
РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....	37
5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу..	37
5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	37
5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.....	40
5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	41
5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	47
5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту.....	50
5.3. Підбір технологічного обладнання для післяферментаційних стадій з урахуванням матеріальних потоків по стадіях.....	66
РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання.....	71
РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми.....	76

РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва.....	98
8.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів.....	98
8.2. Мікробіологічний контроль.....	113
8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	114
8.3.1. Концентрація біомаси.....	114
8.3.2. Визначення концентрації лікопіну.....	114
8.3.3. Визначення концентрації джерела вуглецю.....	115
8.3.4. Визначення концентрації амінного азоту.....	115
8.4. Показники якості готового продукту.....	117
РОЗДІЛ 9. Автоматизація ділянки виробництва.....	120
РОЗДІЛ 10 Охорона довкілля.....	124
10.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів.....	124
10.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва.....	126
10.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів.....	126
10.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів.....	127
10.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів.....	127
10.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів.....	127
ЛІТЕРАТУРА.....	128
ДОДАТКИ.....	137

## ВСТУП

На сьогоднішній день сучасні біотехнології дозволяють вирішувати велику кількість проблем, з якими стикається населення як розвинених країн, так і країн не достатньо розвинених. Серед таких проблем можна визначити проблему не достатнього споживання антиоксидантів та каротиноїдів. Одним таким виходом із даної ситуації є введення на ринок фармацевтичних препаратів, які будуть збагачені вітамінами та антиоксидантами, серед яких можна виділити і лікопін. Лікопін – це каротиноїд, який міститься в помідорах. Лікопін має загальнозміцнювальну дію на організм і володіє великим набором цінних фармакологічних властивостей. Пригнічуючи в організмі вільнорадикальне окислення, лікопін стабілізує імунний статус організму, поліпшує протікання ряду найважливіших біологічних процесів в організмі, в тому числі нормалізує рівень глюкози в крові, ліпідний обмін, зір і контролює проліферацію (новоутворення) клітин. Була встановлена висока ефективність використання лікопіну при лікуванні захворювань передміхурової залози, легень, шлунка, катаракти, ішемічної хвороби серця, атеросклерозу [1]. Але, наразі, на прилавках супермаркетів в основному генномодифіковані, вирощені в теплицях овочі, які не містять достатню кількість вітамінів для організму людини, тим паче в тому ритмі життя, в якому знаходиться сучасна людина. Часто організму не вистачає ресурсів для підтримання здоров'я. Тому на допомогу приходять альтернативні джерела вітамінів та антиоксидантів у вигляді фармацевтичних препаратів.

Попит на лікопін щорічно зростає. В нашій країні він становить приблизно 2384 кг лікопіну на рік потребує населення. На сьогоднішній день лікопін потрапляє у нашу країну переважно із-за кордону. Фармацевтичний ринок на сьогодні активно працює, він виробляє препарати: Евалар Лікопін, Лікопін (Lyc-O-Mato Clinical Trio), Healthy Origins, Now Foods, Life Extension, Puritan's Pride, 21st

					НУХТ БТЕК 04.02.36 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ВСТУП	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Гордаш Д. Ю.					7	140
Консультант						Кафедра БТМ		
Керівник		Пенчук Ю. М..						
Зав.кафедри		Пирог Т.П.						

Century.

Актуальність роботи заключається в тому, що реалізація даної технології дозволить наситити вітчизняний ринок якісним продуктом, збільшити кількість робочих місць для населення та отриманий препарат буде відповідати усім міжнародним стандартам з подальшою орієнтацією на експорт.

Новизною даної роботи є використання двох штамів гетероталічного гриба *Blakeslea trispora* NRRL 2895 (+) та *Blakeslea trispora* I5 (-), які при сумісному культивуванні на середовищі складу: крохмаль кукурудзяний – 50; соєве борошно – 25; бавовняне масло – 40;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 1,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,5; тіамін · HCl - 0,002, за тривалості культивування 120 год дають змогу одержати 1,3 г/л лікопіну [2], що є більш технологічно в порівнянні зі штамми, які використовувались раніше *Blakeslea trispora* ATCC 14,271 (+) та ATCC 14,272 (-) (0,9 г/л), *Blakeslea trispora* Б-1 та Б-2(0,04 г/л): більше продукту, менша тривалість культивування [3, 4].

Також новизною запропонованого проекту є послідовне використання обладнання для одержання посівного матеріалу, що дозволить зменшити кількість апаратів для культивування, а це є економічно доцільним та вигідним.

## РОЗДІЛ 1

### ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

В теперішній час в світі зростає інтерес до каротиноїду лікопіну як засобу для профілактики онкологічних і серцево-судинних захворювань. Лікопін - каротиноїдний пігмент, є тетратерпеном, що складається з восьми ізопренових одиниць, за будовою - прямий вуглеводневий ланцюг з 13 подвійними зв'язками, з який 11 кон'юговані (Рис. 1.1), молекулярна маса (в а.е.м.): 536,87.

Температура кипіння 660,9°C.

**Брутто-формула** (по системі Хілла для органічних речовин):  $C_{40}H_{56}$ .

**Систематичне найменування:** 2,6,10,14,19,23,27,31-октаметілдоотріаконтатрідекаен-2,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24,26,30.

**Скорочення:**  $\psi$ -каротин.

**Тип речовини:** органічний.

**Зовнішній вигляд:** червоно-фіолетові кристали.

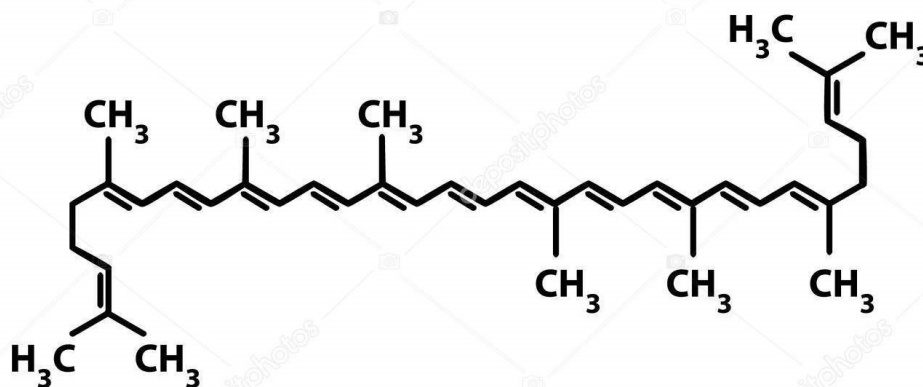


Рис. 1.1. Структурна формула лікопіну.

					НУХТ БТЕК 04.02.36 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Гордаш Д. Ю.				РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	Літ.	Арк.	Аркушів
Консультант							9	140
Керівник	Пенчук Ю. М..					Кафедра БТМ		
Зав.кафедри	Пирог Т.П.							

Лікопін міститься в яскравих червоних овочах і фруктах, його зміст зазвичай корелює з інтенсивністю червоного забарвлення плода. Дослідження останніх років свідчать про те, що лікопін поряд з фарбувальною функцією має самостійне значення як біологічно активна добавка. Рекомендований адекватний рівень споживання лікопіну в добу становить 5 мг, а верхній допустимий рівень - 10 мг. Основним харчовим джерелом лікопіну є томати - до 80% від загального споживання в західних країнах. Залежно від сорту томатів, зміст лікопіну в них становить від 5 до 50 мг/кг.

Термічна обробка незначно впливає на зміст лікопіну. Проте пропарення та прожарка призводить до концентрування лікопіну в кінцевому продукті. Так, якщо в свіжих помідорах лікопіну міститься до 50 мг / кг, то в кетчупу вже до 140 мг/кг, а в томатній пасті - до 1500 мг/кг. Біодоступність лікопіну зазвичай становить близько 40%. Біологічна доступність для людини лікопіну з томатної пасты в 2,5 рази вище, ніж зі свіжих томатів. Всмоктування лікопіну в шлунково-кишковому тракті залежить від наявності в їжі жирів. Оптимальна абсорбція досягається при тепловій обробці лікопінмісних продуктів з жирами. Лікопін з їжі виявляється в крові в першу добу. Максимум концентрації спостерігається через 24 години після одноразового прийому [1].

Останніми роками в якості продуцентів лікопіну почали використовувати нижчі гриби, та рекомбінантні бактерії (наприклад, *E. coli*), оскільки біотехнологічні способи одержання лікопіну набагато ефективніші, дешевші та незалежні від кількості врожаю.

Найбільш активними продуцентами лікопіну є гриби *Phycomyces blakesleanus* і *Blakeslea trispora*. У гриба *Blakeslea trispora* в залежності від особливостей штаму і умов культивування рівень накопичення лікопіну коливається в інтервалі 0,944 – 50 мг/г. Рекомбінантні бактерії *E. coli* також в залежності від особливостей штаму та умов культивування від 20 – 40 мг/г сухої біомаси.

Лікопін має загальнозміцнювальну дію на організм і володіє великим набором цінних фармакологічних властивостей. Пригнічуючи в організмі вільнорадикальне окислення, лікопін стабілізує імунний статус організму,

поліпшує протікання ряду найважливіших біологічних процесів в організмі, в тому числі нормалізує рівень глюкози в крові, ліпідний обмін, зір і контролює проліферацію (новоутворення) клітин. Була встановлена висока ефективність використання лікопіну при лікуванні захворювань передміхурової залози, легень, шлунка, катаракти, ішемічної хвороби серця, атеросклерозу. Біологічна активність лікопіну пов'язана, перш за все, з його антиоксидантними властивостями, тобто здатністю пригнічувати вільнорадикальні процеси в клітинах. При цьому було показано, що лікопін володіє більш вираженою здатністю усувати шкідливий вплив синглетного кисню в порівнянні з  $\beta$ -каротином [3].

### **Спосіб застосування**

Дорослим по 1 капсулі один раз на день під час їжі. Тривалість прийому - не менше 1 місяця.

### **Протипоказання**

Індивідуальна непереносимість компонентів, вагітність, годування груддю. Перед застосуванням необхідно проконсультуватися з лікарем.

### **Умови зберігання**

При температурі не вище + 25 ° С [1].

## РОЗДІЛ 2

### ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

#### 2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

До теперішнього часу основним джерелом отримання лікопіну були рослини, зокрема, спеціально селекційовані сорти томатів. Однак використання в якості продуцентів лікопіну нижчих грибів та сучасні біотехнологічні способи виробництва дозволили отримувати цей препарат з більшою ефективністю. При цьому, виробництву не загрожує втрата урожаю від дії несприятливих погодних факторів або фітопатогенних мікроорганізмів [5]. Вже до кінця 80-х років минулого століття була розроблена біотехнологія одержання цього каротиноїду з використанням мукорового гриба *Blakeslea trispora* [6].

Різні водорості та гриби продукують внутрішньоклітинні каротиноїди, включаючи  $\beta$ -каротин і лікопін. *Blakeslea trispora*, *Mucor circinelloides*, *Candida utilis* і *Phycomyces blakesleeanus* мають здатність виробляти лікопін. *B. trispora* має перевагу тим, що їй не потрібні особливі умови для культивування [4].

Для вибору біологічного агента порівнюємо різні штами *Blakeslea trispora* (*Blakeslea trispora* Б-1, Б-2, *Blakeslea trispora* ATCC 14,271 (+), ATCC 14,272 (-) та *B. trispora* NRRL 2895 (+), I5 (-)) та генно-інженерний штам *Escherichia coli* LYC101-37Almgs(pPlsb-plsc) (Таблиця 2.1).

Процес виробництва лікопіну з використанням *Blakeslea trispora*, як продуцента потребує два етапи: окреме культивування двох штамів для інокулянту та їх сумісне культивування для отримання лікопіну.

					НУХТ БТЕК 04.02.36 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Гордаш Д. Ю.					12	140
Консультант								
Керівник		Пенчук Ю. М.						
Зав.кафедри		Пирог Т.П.						Кафедра БТМ

Обираючи продуцент для біосинтезу спочатку порівнюють різні штами продуцентів за показниками синтезу та часом культивування (Табл. 2.1).

У штамів *Blakeslea trispora* ATCC 14,271 (+) та ATCC 14,272 (-) концентрація синтезованого лікопіну становить 944,8 мг/л за тривалості біосинтезу 168 год. *B. trispora* NRRL 2895 (+), I5 (-) синтезує значну кількість лікопіну (1305 мг/л) за 120 год. *Blakeslea trispora* Б-1, Б-2 синтезує 400 мг/л за 26 год.

Рекомбінантний штам *Escherichia coli* LYC101-37Almgs(pPlsb-plsc) продукує 358,9 мг/л лікопіну, на біосинтез якого витрачається 48 год.

Батьківським штамом для *Escherichia coli* LYC101-37Almgs(pPlsb-plsc) являється *Escherichia coli* LYC101 (pACYC184-M). Порівняно з штамом LYC101 (pACYC184-M), титр лікопіну та питома продукція зросли на 26,7 і 26% . Значне поліпшення вироблення лікопіну у штамі LYC101-37Almgs (pPlsb-plsc) спричинено синергетичним ефектом синтезу мембрани та інженерії морфології мембран. На рівні інженерії морфології мембрани, Almgs (моноглюкозилдіазицилгліцеролсинтаза) викликав утворення мембранних штабелів або каналців і збільшив площу поверхні мембрани, що, ймовірно, збільшило попит на мембранні будівельні блоки, необхідні для виконання такого збільшення. А переекспресія plsb (гліцерол-3-фосфат-ацилтрансфераза) та plsc (1-ацилгліцерол-3-фосфат-ацилтрансфераза) посилила синтез мембран, задовольнила попит на мембранні будівельні блоки та домоглася синергетичного ефекту на виробництво лікопіну [7]. Це досить цікавий продуцент, але на виході лікопіну значно менше, ніж у *B. trispora* NRRL 2895 (+) та *B. trispora* I5 (-).

Проте така порівняльна характеристика технологічного процесу є недостатньою. За табл. 2.2 можна порівняти вартість компонентів на 1 л поживного середовища для культивування продуцентів.

Бачимо що, найдешевше поживне середовище виходить у *Escherichia coli* LYC101-37Almgs(pPlsb-plsc), але і, нагадаю, вихід концентрації лікопіну має дуже низький.

Найдороже середовище виходить у *Blakeslea trispora* Б-1 та Б-2 з також дуже низькими показниками виходу продукту.

Поглянувши на табл. 2.3 можемо порівняти умовну вартість 1 мг лікопіну та його кількість за 1 год культивування.

Подуцент *Blakeslea trispora* Б-1 та Б-2 має найбільшу кількість утвореного лікопіну за 1 год, але 1 мг продукту вартує значно дороще, ніж у інших штамів. Тим паче що на 1л сухої біомаси утворюється лише 400 мг лікопіну, що є дуже не вигідно.

## Порівняльна характеристика продуцентів лікопіну

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Концент рація лікопіну , мг/л	Умови культивування	Література
<i>Blakeslea trispora</i> ATCC 14,271 (+) та ATCC 14,272 (-)	Одержання інокулянту	944,8	120 год, 28 °С рН 6,5	Sevgili A., Erkmen O. / Improved Lycopene Production from Different Substrates by Mated Fermentation of <i>Blakeslea Trispora</i> / 2019 Apr [4]
	Дріжджовий екстракт - 4,0, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - 1,0, MgSO <sub>4</sub> - 0,5, крохмаль - 15,0			
	Біосинтез		168 год, 28 °С рН 6,5	
	Дріжджовий екстракт - 1,0, Глюкоза – 40 аспарагін - 2,0, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - 1,5 MgSO <sub>4</sub> - 0,5.			
<i>Blakeslea</i>	Одержання інокулянту		26-27 ° С, 72 год	Патент № 2270868 Авчиева П. Б., Зорина Л. Б., Буторова И. А.,
	Соєва мука – 45, Кукурудзяне			

<i>trispора</i> Б-1 та Б-2	борошно – 23, $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - 0,5 Тиаминхлорид - $2 \times 10^{-4}\%$	400	(-), 48 год(+) рН 6,8	Деев С. В., Авчиев М. И./ Способ получения ликопина, фосфолипидов, жирных кислот и эргостерина путем совместного культивирования (+) и (-) штаммов гриба <i>Blakeslea trispора</i> [3]
	Биосинтез		26-28 °С, 26 год, рН 6,8	
	Глюкоза- 20 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 9,0 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ - 5,8 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ - 2,5 $\text{MgSO}_4$ - 0,34 Пептон- 20 Тиаминхлорид- $2 \times 10^{-4}\%$			
<i>B. trispора</i> NRRL 2895 (+) та <i>B. trispора</i> I5 (- ).	Одержання інокулянту кукурудзяний крохмаль - 30, соєвий шрот - 50, $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - 1,5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5 тіамін · HCl - 0,002	1305	25 ° С, 48 год, рН 6,5	Feng L., Wang Q., Yu X., Kwame F./ Effects of exogenous lipids and cold acclimation on lycopene production and fatty acid composition in <i>Blakeslea trispора</i> / 2019 Oct 11 [2]
	Биосинтез крохмаль кукурудзяний - 50, соєвий шрот - 25, бавовняна оля - 40, $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - 1,5, $\text{MgSO}_4 \cdot$ $7\text{H}_2\text{O}$ -0,5 тіамін · HCl - 0,002		25 ° С, 120 год, рН 6,5	

<p><i>Escherichia coli</i> LYC101-37Almgs(pPl sb-plsc)</p>	<p>гліцерину -15, лимонної кислоти - 1,7, КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> · 3Н<sub>2</sub>О – 10,5, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub> - 6, MgSO<sub>4</sub> · 7Н<sub>2</sub>О – 3,44 та 10 мл розчину мікроелементів*</p>	<p>358,9</p>	<p>37 ° С, 48 год, рН 6,5</p>	<p>Wu T., Ye L., Zhao D., Li S., Li Q., Zhang B., Bi C. / Engineering membrane morphology and manipulating synthesis for increased lycopene accumulation in <i>Escherichia coli</i> cell factories / 2018 May 25 / doi: 10.1007/s13205-018-1298-8 [7]</p>
--	--	--------------	-----------------------------------	---

\*склад розчину мікроелементів: 10 мл розчину мікроелементів: FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O - 10, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O -5,25, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O – 3,0, MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O – 0,5, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10H<sub>2</sub>O – 0,23, CaCl<sub>2</sub> – 2,0, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> – 0,1

## 2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Таблиця 2.2

### Вартість компонентів поживного середовища для культивування продуцентів

Продуцент	Компонент	Ціна, грн/кг	Вартість, грн	Джерело
<i>Blakeslea trispora</i> ATCC 14,271 (+) та ATCC 14,272 (-)	Дріжджовий екстракт (1,0)	1632	1,6	8
	Глюкоза (40)	24	0,96	8
	Аспарагін (2,0)	490	0,98	9
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (1,5)	25	0,04	10
	MgSO <sub>4</sub> (0,5)	7,60	0,0038	11
Вартість 1 л середовища – 3,60 грн.				
<i>Blakeslea trispora</i> Б-1 та Б-2	Глюкоза (20)	24	0,48	8
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (9,0)	20	0,18	12
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (5,8)	96	0,55	13
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (2,5)	25	0,06	12
	MgSO <sub>4</sub> (0,34)	7,60	0,0025	13
	Пептон (20)	750	15	14
	Тіамінхлорид (0,002)	26	0,00005	15
Вартість 1 л середовища – 16, 30 грн.				
<i>B. trispora</i> NRRL 2895 (+) та <i>B. trispora</i> I5 (- ).	Крохмаль кукурудзяний (50)	30	1,5	16
	Соєвий шрот (25)	13	0,325	17
	Бавовняна олія (40)	130	5,2	18
	KN <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1,5)	120	0,144	19
	MgSO <sub>4</sub> (0,5)	7,60	0,0038	14
	Тіамінхлорид (0,002)	26	0,00005	15
Вартість 1 л середовища – 7,17 грн.				
<i>Escherichia coli</i> LYC101- 37Almgs(pPlsb-plsc)	Гліцерин (15)	60	0,9	20
	Лимонна кислота (1,7)	24	0,03	21
	KN <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (10,5)	120	1,26	19
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (6)	36	0,22	22
	MgSO <sub>4</sub> ( 3,44)	7,60	0,03	14
Вартість 1л середовища – 2,44 грн.				

**Примітка.\*** - Ціни наведено станом на березень 2020 р.

**Умовна вартість 1 мг лікопіну, який синтезується на різних ростових субстратах**

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація лікопіну, мг/л	Умовна вартість 1 мг цільового продукту, грн/мг	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного лікопіну за годину, мг/год
<i>Blakeslea trispora</i> ATCC 14,271 (+) та ATCC 14,272 (-)	3,60	944,8	0,004	168	5,6
<i>Blakeslea trispora</i> Б-1 та Б-2	16,30	400	0,04	26	15,3
<i>B. trispora</i> NRRL 2895 (+) та <i>B. trispora</i> I5 (-).	7,17	1305	0,005	120	10,9
<i>Escherichia coli</i> LYC101-37Almgs(pPls b-plsc)	2,44	358,9	0,007	48	7,5

Штам *B. trispora* NRRL 2895 (+) та *B. trispora* I5 (-) має значні переваги серед інших. У нього достатньо низька вартість за 1 мг лікопіну та висока кількість утвореного лікопіну за 1 год. Основним субстратом поживного

середовища *B. trispora* NRRL 2895 (+) та *B. trispora* I5 (-) є кукурудзяний крохмаль. Також середовище містить багато солей, жирів, мінеральних речовин, амінокислот та білків. Тривалість культивування 120 год, що на 48 год менше ніж у штама *Blakeslea trispora* ATCC 14,271 (+), ATCC 14,272 (-), який при цьому продукує менше лікопіну (944,8 мг/л), в той час як вихід продукту у *B. trispora* NRRL 2895 (+) та *B. trispora* I5 (-) 1305 мг/л.

Отже, порівнявши різні штами за кількістю виходу продукту, вартістю поживного середовища та вартістю отриманого продукту можемо зробити висновок, що продуцент *B. trispora* NRRL 2895 (+) та *B. trispora* I5 (-) є найвигіднішим для біосинтезу лікопіну.

### **2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічно агента**

*Blakeslea trispora* піддається як статевому, так і нестатевому розмноженню. Безстатева репродуктивна фаза *Blakeslea trispora* включає утворення спорангіоспор, що виробляються в спорангіях. Колонії *B. trispora* швидко ростуть на агаризованих середовищах при 25 ° C. Спочатку вони білі, але в міру дорослішання стають жовтого, блідо-коричневого або дуже темно-коричневого кольору [23].

Однак, залежно від штаму та середовища на якому він культивується колонії можуть мати різний колір [24]:

- Середя Роулі-Тома з додаванням кукурудзяного екстракту.

Зростання обох (+) і (-) штамів слабке. Повітряний міцелій сірий паутиноподібний, стелється. Спороутворення дуже слабке.

- Середя GAT для *Blakeslea* з глюкозою, аспарагіном і тіаміном.

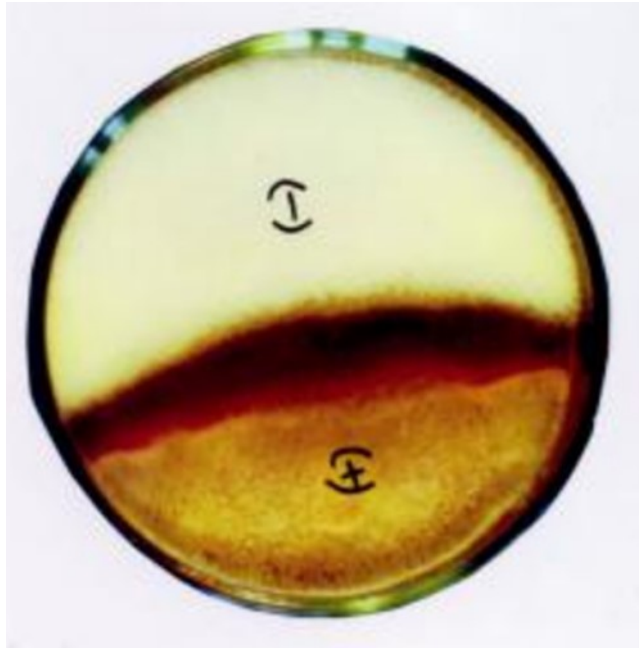
Зростання обох (+) і (-) штамів слабке, уповільнене. Повітряний міцелій білий, злегка підводиться. Субстратний міцелій розвинений нерівномірно, має оранжеве забарвлення. Спороутворення слабке.

- Середя Роулі-Тома з сахарозою.

Обидва (+) і (-) штаму утворюють високий, пухнастий, повітряний міцелій білого кольору. Субстратний міцелій жовтий. Спор практично не утворює.

- Спільне зростання (+) і (-) штамів на сусло-агарі (Рис. 2.1)

При спільному зростанні в місці зіткнення колоній спостерігається утворення широкої, чітко вираженою смуги цегляно-червоного міцелію, на якому в невеликій кількості формуються чорні зігоспори.



**Рис.2.1. Спільне зростання (+) і (-) штамів *Blakeslea trispora* на сусло-агарі.**

Даний гриб є мезофільним мікроорганізмом, найінтенсивніший ріст його спостерігається в температурних межах від 20 °С до 34 °С. Оптимальне значення рН 6,2 – 8,4 [23].

Гіфи *B. trispora* не септовані, дуже щільні та сильно розгалужені. Під час статевого розмноження утворюються зігоспори, які містять високі концентрації тригліцеринів, ліпідів і фосфатидилхоліну. Зигоспори можуть зберігатися протягом тривалого часу, і їх проростання залежить від цитоплазматичної регуляторної системи, яка підтримує спокій і попереджує проростання за наявності несприятливих умов росту. Зигоспори мають розмір від 40 до 80 мкм. Вони мають кулясту або злегка сплюснуту форму. *Blakeslea trispora* має гетероталічну систему спаровування, що має (+) та (-) типи спарювання. Контакт та взаємообмін між протилежними типами спарювання є необхідним

попередником для стимулювання статевого розмноження та розвитку зигоспор. Каротиноїди утворюються лише при спільному рості штамів (+) та (-) [24].

#### **2.4. Таксономічний статус біологічного агента**

Синонімом *Blakeslea trispora* є *Choanephora trispora*. Класифікація наведена згідно літератури [25].

**Царство:** Гриби;

**Тип:** Мукоромікота;

**Клас:** Мукороміцети;

**Порядок:** Mucorales;

**Сімейство:** Choanephoraceae;

**Рід:** Blakeslea;

**Вид:** trispora.

## РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

### 3.1. Потреба у цільовому продукті.

Лікопін – це каротиноїд, що має загальнозміцнювальну дію на організм і володіє великим набором цінних фармакологічних властивостей. Пригнічуючи в організмі вільнорадикальне окислення, лікопін стабілізує імунний статус організму, поліпшує протікання ряду найважливіших біологічних процесів в організмі, в тому числі нормалізує рівень глюкози в крові, ліпідний обмін, зір і контролює проліферацію (новоутворення) клітин.

Лікарських препаратів на основі лікопіну, як таких, не існує. Лікопін вживається як біологічно активна добавка (БАД). На українському ринку можна знайти численну БАДів на основі лікопіну. У табл. 3.1 я виділила найпоширеніші:

					НУХТ БТЕК 04.02.36 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ		
Розроб.	Гордаш Д. Ю.				Літ.	Арк.	Аркушів
Консультант						23	140
Керівник	Пенчук Ю. М..				Кафедра БТМ <i>Таблиця 3.1</i>		
Зав.кафедри	Пирог Т.П.						

### Порівняння препаратів на основі лікопіну

Назва препарату	Кількість лікопіну в капсулі, мг/капс.	Правила прийому препарату	Кількість капсул в упаковці	Література
Евалар Лікопін	6,5	1 капс./день, 1 міс і більше	30	26
Лікопін (Lyc-O-Mato Clinical Trio), Healthy Origins	30	2 капс./день, 1 міс.	60	27
Лікопін, Lycorene, Now Foods	10	3 капс./день, 1-4 міс.	120	28
Лікопін, Life Extension	15	1 капс/день. 1-3 міс.	90	29
Лікопін, Lycorene 20 mg, Puritan's Pride	20	1-2 капс/день, 1-2 міс.	60	30
Лікопін (Lycorene), 21st Century	25	1 капс/день, 2 міс	60	31

### 3.2. Розрахунок потужності виробництва.

Отже, розглянемо основні захворювання, для яких може використовуватись лікопін як профілактична добавка: при лікуванні захворювань передміхурової залози, легень, шлунка, катаракти, ішемічної хвороби серця, атеросклерозу. Для кожного захворювання рекомендуються певні дози вживання лікопіну (табл. 3.2).

Розглянемо статистику хворих на серцево-судинні захворювання станом на 2018 по Україні - 52923,6 на 100 тис. населення, зважаючи, що населення України становить 41 732 779 осіб, то маємо:  $41\,732\,779/100\,000 \cdot 52923,6 = 22\,086\,489$  приблизно хворих осіб в Україні. Але, зважаючи, що лікопін – не лікарський засіб, ми не можемо його використовувати для критичних, хронічних станів, ми можемо розглядати його як профілактику. Як ми знаємо, профілактика може запобігти розвитку хвороб серця. Але не все населення буде використовувати лікопін, тому будемо відштовхуватися від факторів ризику [34]:

- вік (чим старша людина, тим вище ризик) – від 65 и вище, в Україні 7146 499 осіб[32];
- тютюнопаління [35]:
  - частка курців серед українських чоловіків становить 50% (всього чоловіків 14205600 осіб, отже курців:  $14\,205\,600/2 = 7\,102\,800$  осіб). Серед жінок сумарна кількість курців досягає 15% (всього жінок 22389 339 осіб, отже курців:  $22389\,339 \cdot 15/100 = 3\,358\,401$  особа).

Отже, всього людей в зоні ризику серцево-судинних захворювань приблизно:  $7146\,499 + 7\,102\,800 + 3\,358\,401 = 17\,607\,700$  осіб. Всі вони також не будуть приймати препарат, тому припустимо, що нам потрібно забезпечити лише 1% цих людей, а отже, 176 077 осіб. Припускаючи, що препарат буде використовуватися пацієнтом 6 місяців на рік, маємо  $176\,077 \cdot 3 = 528231$  флаконів на всіх хворих/рік. Оскільки в 1 флаконі 60 капсул, а в 1 капсулі 25 мг лікопіну, маємо  $528\,231 \cdot 60 \cdot 25 = 792\,347\,000$  мг, або 792 кг лікопіну на рік.

Щорічно на рак простати хворіють біля 7495 осіб. Але це можна попередити за допомогою профілактики лікопін-вмістними препаратами.

Отже, приблизно розрахуємо скільки чоловіків знаходяться в зоні ризику по Україні.

Загальна кількість чоловічого населення 19 343 440 осіб [32]. В зоні ризику найчастіше чоловіки за 65 років і старших, їх кількість 2 135 291 осіб [33] ( 80% - 1 708 233 особи). Але, зрозуміло, що всі не будуть приймати лікопін, не зважаючи на те, яка буде рекламна кампанія, вважається, що буде приймати препарат лише 1% (17 082 осіб). Отже, припускаючи, що препарат буде використовуватися пацієнтом 6 місяців на рік, для забезпечення профілактики всіх осіб потрібно:  $17\ 082 \cdot 3 = 51\ 246$  флаконів на рік. Зважаючи на те, що в 1 флаконі 60 капсул, а в 1 капсулі 20 мг лікопіну, маємо  $51\ 246 \cdot 60 \cdot 20 = 61495200$  мг, або 61,5 кг лікопіну на рік.

У світі налічується не менше 2,2 мільярда випадків порушення зору або сліпоти, причому більше 1 мільярда з них є наслідком відсутності профілактики або лікування.

За офіційними даними, в Україні щорічно реєструється в середньому 4,5 тисяч інвалідів по зору, з них половина - незрячі. В цілому кількість незрячих і слабозорих в Україні значно перевищує даний показник. Прогноз динаміки загрози сліпоти в країні невтішний. Втім, світова практика говорить, що в 80% випадків можна уникнути сліпоти. Попередити сліпоту, або покращити слабкий зір на ранніх стадіях значно допомагає профілактика. Лікопін – якраз той препарат, який використовується для профілактики захворювань зору.

В зоні ризику, звичайно, люди похилого віку – від 65 и вище, їх в Україні 7 146 499 [32]. Припускаємо, що БАДи будуть приймати лише 2% (142930 осіб).

В комп'ютерну еру, тип паче через пандемію, люди буквально змушені вчитися та працювати, просто шукати потрібну та не потрібну буденну інформацію за комп'ютером та в телефонах. Не секрет, що через це, в першу чергу перенапружуються очі. Тому можна сказати, що до групи ризику увійшло майже все населення світу різного віку. Але ми говоримо лише про Україну, тому приймемо до уваги населення нашої країни, що найбільш залежне від сучасних порядків у суспільстві – люди від 14 до 64 років (28 199 524 осіб). Припустимо, що БАДи будуть приймати 1% цих людей – 281995 осіб.

Отже, припускаючи, що препарат буде використовуватися пацієнтом 6 місяців на рік, для забезпечення профілактики всіх осіб потрібно:  $(142930 + 281995) \cdot 3 = 1\,274\,775$  флаконів на рік. Оскільки в 1 флаконі 60 капсул, а в 1 капсулі 20 мг лікопіну, маємо  $1\,274\,775 \cdot 60 \cdot 20 = 1\,912\,162\,500$  мг, або 1530 кг лікопіну на рік.

Таблиця 3.2

**Вихідні данні для розрахунку річної потреби у препаратах на основі лікопіну**

Захворювання (профілактика)	Доза препарату на добу, мг	Тривалість прийому, днів	Кількість препарату на 1 людину/день	Кількість хворих в Україні	Загальна кількість флаконів на всіх хворих	Загальна кількість лікопіну на всіх хворих/ рік
Серцево-судинні захворювання	25	60	25	233393	700 179	792
Захворювання передміхурової залози	20	60	20	17 082	51 246	61,5
Вади зору	20	60	20	496 390	1 489 170	1530

Додаємо загальну кількість лікопіну на всіх хворих:  $792 + 61,5 + 1530 = 2384$  кг лікопіну на рік. Зважаючи, що на ринку представлено 6 основних препаратів, ділимо на 6 загальну кількість лікопіну на рік:  $2384 : 6 = 397$  кг лікопіну, які треба виробити за рік.

Ми не можемо забезпечити потребу в лікопіні по всій Україні, тому візьмемо 50 % від загальної кількості лікопіну на хворих:

$$397/2 = 199 \text{ кг лікопіну.}$$

Оскільки продуцент лікопіну *B. trispora* NRRL 2895 (+) та *B. trispora* I5 (-) синтезує у культуральній рідині 1305 мг/л лікопіну, для розрахунку потужності

виробництва розрахуємо кількість культуральної рідини для отримання 199 кг лікопіну:

$$V_{кр} = 199/1,3 = 153 \text{ м}^3/\text{рік культуральної рідини.}$$

Отже, потужність виробництва становить 153 м<sup>3</sup> культуральної рідини на рік.

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

Для забезпечення потреб в лікопіні на теренах України потрібно виробляти 153 м<sup>3</sup> культуральної рідини на рік:

- 1) Кількість продукту на добу. Прийmemo кількість робочих трудоднів ( $T_{рд}$ ) 290, тоді кількість продукту на добу ( $V_d$ ) становитиме:

$$V_d = V_{кр}/T_{рд} = 153 / 290 = 0,53 \text{ м}^3/\text{добу}$$

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

$$V_{крц} = K_1 * V_d * T_{цф} / 24 = (1,1 * 0,53 * 130) / 24 = 3,2 \text{ м}^3/\text{цикл.}$$

де  $T_{цф}$  – цикл роботи ферментера (130 год), що включає час біосинтезу (120 год), та час підготовки ферментера – 10 год. Підготовка ферментатора включає: миття та огляд – 2 год, перевірка на герметичність – 2 год, стерилізація – 2 год, охолодження – 1 год, завантаження середовища – 1,5 год, засів – 0,5 год, відвантаження культуральної рідини – 1 год;  $K_1$  – коефіцієнт запасу, що враховує ймовірність нестерильних операцій (1,1-1,5).

- 3) Об'єм готового поживного середовища та посівного матеріалу у виробничому ферментері з врахуванням втрат при біосинтезі  $E_{ф} = 0,1$  становить:

$$V_{ф} = V_{кр}/(1-E_{ф}) = 3,2 / (1-0,1) = 3,56 \text{ м}^3.$$

- 4) Геометричний об'єм ферментера для отримання 3,56 м<sup>3</sup> культуральної рідини, з коефіцієнтом заповнення 0,6 має становити:

$$V_{г} = V_{ф}/K_{зап} = 3,56 / 0,6 = 5,9 \text{ м}^3, \text{ найближчий ферментер } 6,3 \text{ м}^3.$$

Перевіряємо коеф. заповнення:  $K_3 = 3,56 / 6,3 = 0,56$ . Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

- 5) Кількість циклів на рік:

$$N_{цк} = V_d / V_{крц} = 153 / 3,2 = 48 \text{ цикл/рік}$$

### 3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл необхідно отримати  $V_{кр} = 3,2 \text{ м}^3$  культуральної рідини, але слід врахувати втрати в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10 % ( $E_{\phi}$ ).

$$V_{роб.1} = \frac{V_{кр}}{1 - E_{\phi}} = \frac{3,2}{1 - 0,1} = 3,56 \text{ м}^3$$

де  $E_{\phi}$  – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Для культивування необхідний ферментер, геометричний об'єм якого становить:

$$V_{\phi.1} = \frac{V_{роб.1}}{Kз} = \frac{3,56}{0,6} = 5,9 \text{ м}^3$$

Найближчий за номінальним об'ємом ферментер  $V_{сф} = 6,3 \text{ м}^3$ .

Уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап.1} = \frac{V_{роб.1}}{V_{сф}} = \frac{3,56}{6,3} = 0,56$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

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

$$V_{пс1} = \frac{V_{роб.1}}{1 + X_{\phi}} = \frac{3,56}{1 + 0,1} = 3,24 \text{ м}^3$$

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

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 3,56 - 3,24 = 0,32 \text{ м}^3$$

### **Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для вирощування культур у посівних апаратах об'ємом 630 та 60 л**

Оскільки для синтезу лікопіну використовуємо штам + (90% від загальної біомаси) та – (10%), маємо дві лінії їх культивування. Отже, для одержання  $0,32 \text{ м}^3$  посівного матеріалу потрібно розділити на штам + та -, 9:1 відповідно:

$$0,32 = 0,29 + 0,03 \text{ м}^3.$$

Для штаму + необхідно отримати  $0,29 \text{ м}^3$  посівного матеріалу, але слід врахувати втрати в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10 % ( $E_{\phi}$ ).

$$V_{\text{роб.2+}} = \frac{V_{\text{пм1+}}}{1-E_{\text{ін}}} = \frac{0,29}{1-0,1} = 0,322 \text{ м}^3$$

Посівний матеріалу ( $0,322 \text{ м}^3$ ) для засівання інокулятора можна отримати під час культивування продуцента у апараті об'ємом:

$$V_{\text{ін1+}} = \frac{V_{\text{роб.2+}}}{K_3} = \frac{0,322}{0,6} = 0,54 \text{ м}^3.$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор  $V_{\text{ін1+}} = 0,63 \text{ м}^3$

Уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.2+}} = \frac{V_{\text{роб.2+}}}{V_{\text{ін1}}} = \frac{0,322}{0,63} = 0,51$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс2+}} = \frac{V_{\text{роб.2+}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{0,322}{1 + 0,1} = 0,293 \text{ м}^3$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм2+}} = V_{\text{роб.2+}} - V_{\text{пс2+}} = 0,322 - 0,293 = 0,029 \text{ м}^3 (29 \text{ л})$$

Для штаму - необхідно отримати  $0,03 \text{ м}^3$  посівного матеріалу, але слід врахувати втрати в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10 % ( $E_{\phi}$ ).

$$V_{\text{роб.2-}} = \frac{V_{\text{пм1-}}}{1-E_{\text{ін}}} = \frac{0,03}{1-0,1} = 0,033 \text{ м}^3$$

Посівний матеріалу ( $0,033 \text{ м}^3$ ) для засівання інокулятора можна отримати під час культивування продуцента у апараті об'ємом:

$$V_{\text{ін1-}} = \frac{V_{\text{роб.2-}}}{K_3} = \frac{0,033}{0,6} = 0,055 \text{ м}^3.$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор  $V_{\text{ін1-}} = 0,06 \text{ м}^3$

Уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.2-}} = \frac{V_{\text{роб.2-}}}{V_{\text{ін1}}} = \frac{0,033}{0,06} = 0,55$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс2-}} = \frac{V_{\text{роб.2-}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{0,033}{1 + 0,1} = 0,03 \text{ м}^3$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм2-}} = V_{\text{роб.2-}} - V_{\text{пс2-}} = 0,033 - 0,03 = 0,003 \text{ м}^3 \text{ (3 л)}$$

### **Розрахунок кількості посівних матеріалів для вирощування культур в інокуляторах об'ємом 63 та 6 л**

Для одержання 29 л посівного матеріалу штаму + розрахунки проводяться аналогічно.

$$V_{\text{роб.3+}} = \frac{V_{\text{пм2+}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{29}{1 - 0,1} = 32,2 \text{ л}$$

Посівний матеріалу (32,2 л) для засівання інокулятора можна отримати під час культивування продуцента у апараті об'ємом:

$$V_{\text{ін.2+}} = \frac{V_{\text{роб.3+}}}{K_{\text{з}}} = \frac{32,2}{0,6} = 53,6$$

Найближчим за номінальним об'ємом інокулятор  $V_{\text{ін2+}} = 63 \text{ л}$ .

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.3+}} = \frac{V_{\text{роб.3+}}}{V_{\text{ін2}}} = \frac{32,2}{63} = 0,51$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс3+}} = \frac{V_{\text{роб.3+}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{32,2}{1 + 0,1} = 29,3 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм3+}} = V_{\text{роб.3+}} - V_{\text{пс3+}} = 32,2 - 29,3 = 2,9 \text{ л}$$

Для одержання 3 л посівного матеріалу штаму - розрахунки проводяться аналогічно.

$$V_{\text{роб.3-}} = \frac{V_{\text{пм2-}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{3}{1 - 0,1} = 3,3 \text{ л}$$

Посівний матеріалу (3,3 л) для засівання інокулятора можна отримати під час культивування продуцента у апараті об'ємом:

$$V_{ін.2-} = \frac{V_{роб.3-}}{Kз} = \frac{3,3}{0,6} = 5,5$$

Найближчим за номінальним об'ємом інокулятор  $V_{ін.2-} = 6$  л.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап.3-} = \frac{V_{роб.3-}}{V_{ін.2-}} = \frac{3,3}{6} = 0,55$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{псз-} = \frac{V_{роб.3-}}{1 + X_{ін}} = \frac{3,3}{1 + 0,1} = 3 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{пмз-} = V_{роб.3-} - V_{псз-} = 3,3 - 3 = 0,3 \text{ л.}$$

### **Розрахунок кількості посівних матеріалів для вирощування культур в колбах на качалці**

Для одержання 2,9 л посівного матеріалу штаму + використовують качалочні колби об'ємом 750 мл та коефіцієнтом заповнення  $K_{зк} = 0,2$ . Кількість колб становитиме:

$$N_{колб+} = \frac{V_{пмз+}}{V_{колб+} \times K_{зк}} = \frac{2900}{750 \times 0,2} = 20 \text{ колб}$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу штаму + необхідно 20 качалочних колб.

Для одержання 0,3 л посівного матеріалу штаму - використовують качалочні колби об'ємом 750 мл та коефіцієнтом заповнення  $K_{зк} = 0,2$ . Кількість колб становитиме:

$$N_{колб-} = \frac{V_{пмз-}}{V_{колб+} \times K_{зк}} = \frac{300}{750 \times 0,2} = 2 \text{ колби}$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу штаму - необхідно 2 качалочні колби.

Отже, процес підготовки інокуляту для виробничого біосинтезу у  $6,3 \text{ м}^3$  ферментері з коефіцієнтом заповнення 0,6 та двома лініями культивування складається з 3 стадій для кожного штаму (+ та -).

## РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

### 4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у *Blakeslea trispora* NRRL 2895 (+) та *B. trispora* I5 (-).

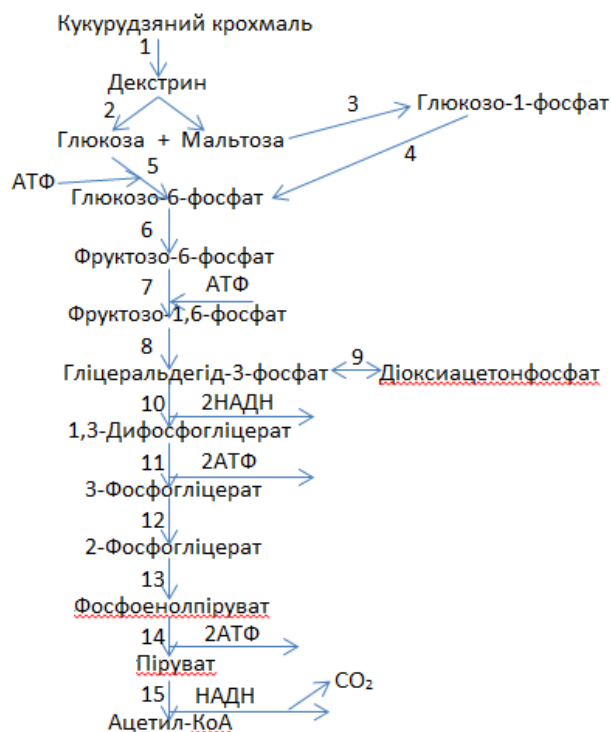
При синтезі лікопіну беруть участь два штами *B. trispora* NRRL 2895 (+) та *B. trispora* I5 (-), окремо ці мікроорганізми не можуть синтезувати лікопін, тому необхідна їх спільна ферментація.

На жаль, на момент виконання цієї роботи, в базі даних Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes була відсутня будь-яка інформація про вид *Blakeslea trispora* (скріншот, який це підтверджує у додатку 1), тому шлях ростового субстрату у біологічного агента був наведений згідно статті.

Джерелом вуглецю та енергії при вирощуванні *Blakeslea trispora* є крохмаль, мономером якого є глюкоза. Згідно статті [36] та даним Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [37] [38], крохмаль залучається до гліколізу. Згідно KEEG (додаток 2, 3), крохмаль за допомогою амілази (КФ: [3.2.1.2](#)) перетворюється на декстрин, який під дією мальтозоглюкоамілази (КФ: [3.2.1.3](#)) розпадається на глюкозу та мальтозу. Мальтоза за допомогою ферменту мальтозофосфорилази (КФ: [2.4.1.8](#)) перетворюється на глюкозо-1-фосфат, який під дією фосфоглюкомутази (КФ: [5.4.2.6](#)) перетворюється на глюкозо-6-фосфат. В цей час глюкоза за допомогою фермента глюкокінази (КФ 2.7.1.2) також перетворюється на глюкозо-6-фосфат, який під дією фермента глюкозо-6-фосфатізомерези (КФ 5.3.1.9) перетворюється на фруктозо-6-фосфат, який за допомогою фермента 6-фосфоглюкокінази (КФ: [2.7.1.11](#)) перетворюється на фруктозо-1,6-фосфат. Фруктозобіфосфатальдолаза класу II (КФ 4.1.2.13) забезпечує перетворення фуктозо-1,6-фосфату на гліцеральдегід-3-фосфат, який

					НУХТ БТЕК 04.02.36 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Гордаш Д. Ю.				РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ		
Консультант							
Керівник	Пенчук Ю. М.					34	140
Зав.кафедри	Пирог Т.П.				Кафедра БТМ		

входить у взаємне зворотнє перетворення з діоксоацетонфосфатом під дією триозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1), та під дією - гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12) гліцеральдегід-3-фосфат перетворюється на 1,3-дифосфогліцерат, який у свою чергу перетворюється на 3-фосфогліцерат за допомогою фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3). 3-фосфогліцерат під дією біфосфатзалежної фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.11) перетворюється на 2-фосфогліцерат, який в свою чергу, перетворюється на ФЕП під впливом енолази (КФ 4.2.1.11). ФЕП під дією ферменту піруваткінази (КФ 2.7.1.40) перетворюється на піруват, а піруват перетворюється на ацетил-КоА під впливом дигідроліпоаміддегідрогенази (КФ 1.8.1.4) (Рис 4.1).

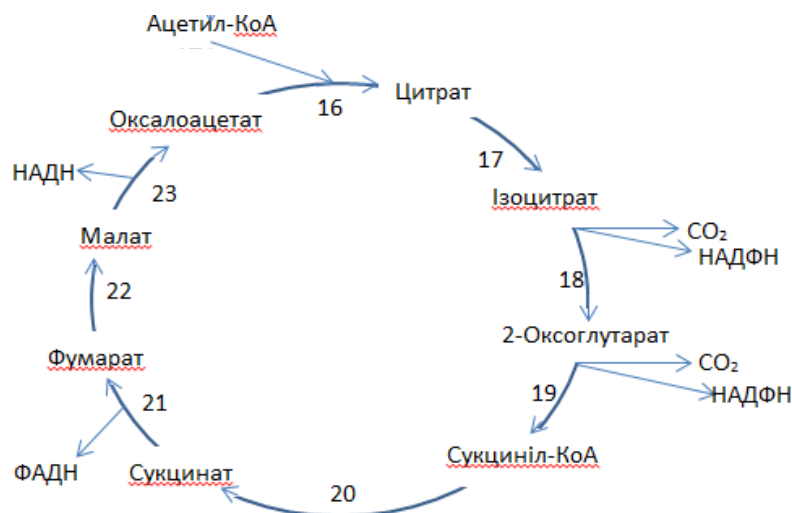


**Рис.4.1. Катаболізм крохмалю у *Blakeslea trispora* згідно KEGG [37][38]**

**Ферменти:** 1 - амілаза (КФ: [3.2.1.2](#)); 2 - мальтозоглюкоамілаза (КФ: [3.2.1.3](#)); 3 - мальтозофосфорилаза (КФ: [2.4.1.8](#)); 4 - фосфоглюкомутаза (КФ: [5.4.2.6](#)); 5 - глюкокіназа (КФ 2.7.1.2); 6 - глюкозо-6-фосфатізомереза (КФ 5.3.1.9); 7 - 6-фосфофруктокіназа (КФ: [2.7.1.11](#)); 8 - фруктозобіфосфатальдолаза, клас II (КФ 4.1.2.13); 9 - триозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); 10 - гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 11 - фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 12 - 2,3-біфосфатзалежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11); 13 - енолаза (КФ

4.2.1.11); 14 - піруваткіназа (КФ 2.7.1.40); 15 - дигідроліпоаміддегідрогенази (КФ 1.8.1.4).

Після гліколізу йде ЦТК, згідно додатку 4 (Рис 4.2):



**Рис. 4.2. Цикл Трикарбонових Кислот згідно KEGG [39]**

**Ферменти:** 16 - цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1); 17 - аконітатгідратаза (КФ 4.2.1.3); 18 - ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42); 19 - дигідроліпоаміддегідрогенази (КФ 1.8.1.4); 20 - сукциніл-КоА синтетаза, альфа-субодиниця (КФ 6.2.1.5); 21 - сукцинатдегідрогеназа, цитохром b 556 субодиниця; 22 — фумаратгідратаза, клас II (КФ 4.2.1.2); 23 — малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37).

## 4.2. Біотрансформація ростового субстрату у лікопін

Утворення лікопіну починається з Ацетил-КоА, який перетворюється на Ацетоацетил-КоА під впливом ферменту ацетил-КоА С-ацетилтрансферази (КФ: [2.3.1.9](#)). Ацетоацетил-КоА за допомогою фермента гідроксиметилглутаріл-КоА синтази (КФ: [2.3.3.10](#)) перетворюється на 3-окси-3-метилглутарил-КоА, який за допомогою гідроксиметилглутаріл-КоА редуктази (КФ: [1.1.1.88](#)) перетворюється на мевалонову кислоту, яка під впливом мевалонат-кінази (КФ: [2.7.1.36](#)) перетворюється на 5-фосфомевалонову кислоту, яка перетворюється на 5-пірофосфомевалонову кислоту за допомогою фосфомевалонаткінази (КФ: [2.7.4.2](#)). 5-пірофосфомевалонівна під впливом пірофосфомевалонат-декарбоксілази (КФ: [4.1.1.33](#)) перетворюється на ізопентенілпірофосфат, який під впливом ізопентеніл-пірофосфат-ізомерази (КФ: [5.3.3.2](#)) взаємоперетворюється з

диметилалілпірофосфатом. Диметилалілпірофосфат претворюється на геранілпірофосфат за допомогою диметилалілтрансферази (КФ: 2.5.1.1). В цей час ізопентенілпірофосфат, також під впливом диметилалілтрансферази (КФ: 2.5.1.1), перетворюється на геранілпірофосфат. Геранілпірофосфат за допомогою фермента фарнезилдифосфатсинтази (КФ: 2.5.1.10) перетворюється на фарнезилпірофосфат, який під впливом геранілгеранілдифосфат синтази типу III (КФ: [2.5.1.29](#)) перетворюється на геранілгеранілпірофосфат. За допомогою фермента 15-цис-фітоїнсинтази (КФ: [2.5.1.32](#)) геранілгеранілпірофосфат перетворюється на фітоїнпірофосфат, а фітоїнпірофосфат на фітоїн. При дії ферменту 15-цис-фітоїндесатурази (КФ: [1.3.5.5](#)) фітоїн перетворюється на фітофлуїн, а фітофлуїн на  $\zeta$ -каротин. Під впливом цета-каротинової десатурази (КФ: [1.3.5.6](#))  $\zeta$ -каротин перетворюється на нейроспорин, а нейроспорин на лікопін (Рис 4.3).

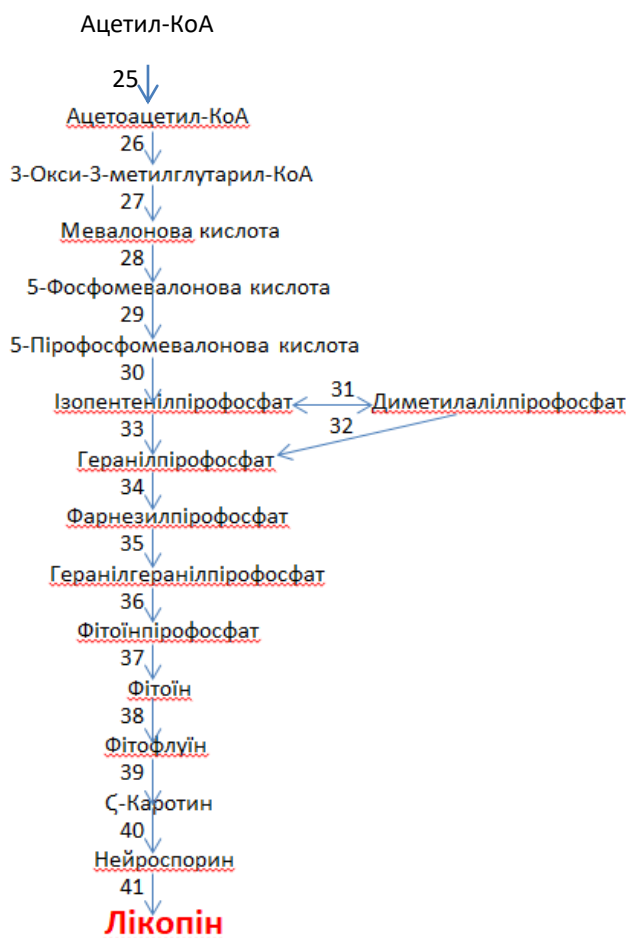
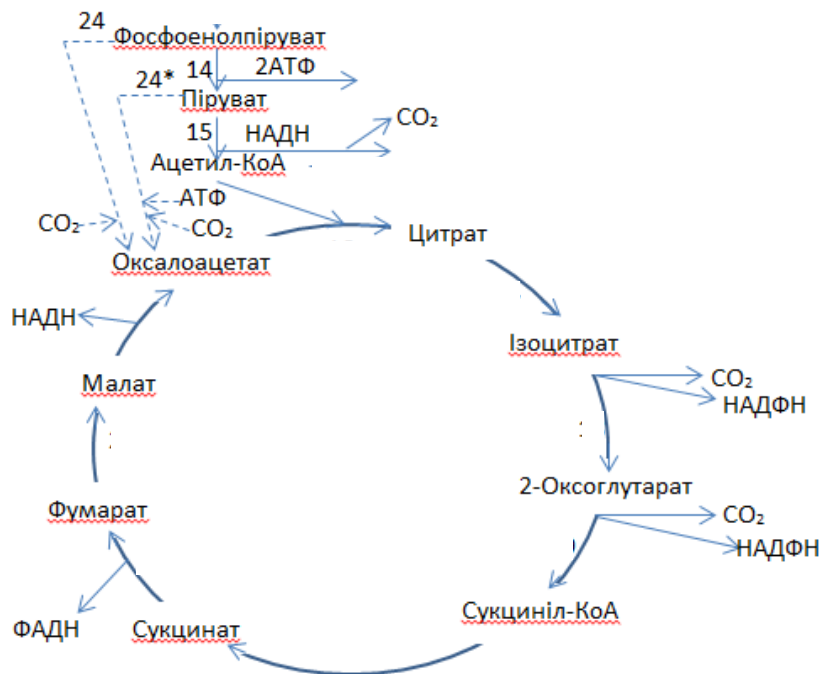


Рис 4.3. Схема утворення лікопіну згідно KEGG (додаток 5,6) [40] [41]

**Ферменти:** 25 - ацетил-КоА С-ацетилтрансфераза (КФ: [2.3.1.9](#)); 26 - гідроксиметилглутаріл-КоА синтаза (КФ: [2.3.3.10](#)); 27 - гідроксиметилглутаріл-КоА редуктаза (КФ: [1.1.1.88](#)); 28 - мевалонат-кіназа (КФ: [2.7.1.36](#)); 29 - фосфомевалонаткіназа (КФ: [2.7.4.2](#)); 30 - пірофосфомевалонат-декарбоксилаза(КФ: [4.1.1.33](#)); 31 - ізопентеніл-пірофосфат-ізомераза (КФ: [5.3.3.2](#)); 32, 33 - диметилалілтрансфераза (КФ: 2.5.1.1); 34 - фарнезилдифосфатсинтаза (КФ: 2.5.1.10); 35 - геранілгеранілдифосфат синтаза, тип III (КФ: [2.5.1.29](#)); 36, 37 - 15-цис-фітоїнсинтаза (КФ: [2.5.1.32](#)); 38, 39 - 15-цис-фітоїндесатураза (КФ: [1.3.5.5](#)); 40, 41 - цета-каротинова десатураза (КФ: [1.3.5.6](#)).

Оскільки субстратом виступає крохмаль, то анаперотичною реакцією буде перехід  $\text{CO}_2$  з ФЕП та пірувату до оксалоацетату (Рис 1.4).



**Рис 4.4.** Перехід  $\text{CO}_2$  з ФЕП та пірувату до оксалоацетату згідно KEGG [39]

Загальну схему катаболізму ростового субстрату можна побачити у додатку 7.

## РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

### 5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

#### 5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

##### Вибір умов і способу культивування.

Є інформація, що культивування штамів *B. trispora* NRRL 2895 (+) та *B. trispora* I5 (-) проводили в колбах на роторному шейкері зі швидкістю перемішування 200 об / хв та при температурі 25 ° С протягом 48 год при рН 6,5.

Гриб *Blakeslea trispora* облігатний аероб, гетероталічний (роздільностатевий), що робить процес культивування та синтезу лікопіну особливим. Штами + та – цього гриба при роздільному розвитку не виробляють каротиноїдів та, відповідно, мають білий колір колоній. Але при сумісному культивування починається вироблення каротиноїдів та колонії набувають помаранчево-малинового кольору. *Blakeslea trispora* – міцеліальний гриб, тому процес ферментації повинен бути максимально акуратний, особливу увагу треба надати вибору ферментера.

Культивування штамів *Blakeslea trispora* доречно лише в рідкому поживному середовищі через те, що цей метод найпростіший та менш затратний для виділення лікопіну.

Лікопін – вторинний метаболіт. Вторинні метаболіти синтезуються в стаціонарній фазі, тому біосинтез лікопіну здійснюється у періодичному процесі культивування, оскільки підтримання експоненційної фази росту є недоцільним.

Перед культивуванням необхідно простерилізувати все обладнання, яке буде використовуватися в процесі, та композиції поживного середовища.

					НУХТ БТЕК 04.02.36 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ		
Розроб.	Гордаш Д. Ю.				Літ.	Арк.	Архівів
Консультант						38	140
Керівник	Пенчук Ю. М.				Кафедра БТМ		
Зав.кафедри	Пирог Т.П.						
					СХЕМИ		

Також потрібно слідкувати за станом рН та температури.

### **Вибір типу ферментера.**

Всі ферментери (біореактори) можна віднести до одного з трьох основних типів: реактори з механічним перемішуванням, барботажні колони, ерліфтні реактори.

Найчастіше використовуються біореактори з механічним перемішуванням (*Рис 5.1 (А)*), оскільки вони мають такі переваги:

- Дозволяють легко міняти технологічні умови;
- Завжди є у продажу;
- Забезпечують ефективну доставку газу до зростаючих клітин (якщо говорити інженерною мовою, мають високий об'ємний коефіцієнт масообміну);
- Є великий досвід їх промислового використання з відповідною регламентаційною літературою.

Але є значний недолік:

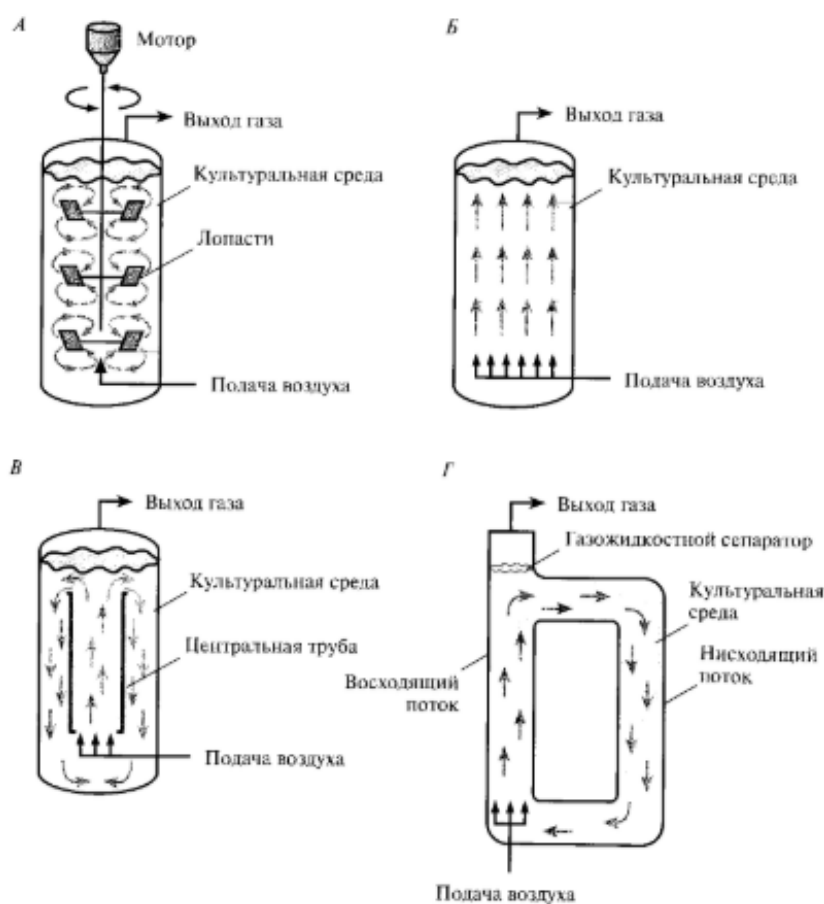
- Виникають значні втрати мікроорганізмів через механічні пошкодження. Зважаючи на те, що вихід лікопину і без того порівняно малий, зайві пошкодження біомаси економічно не вигідні.

Механічне перемішування забезпечується за допомогою механічної мішалки, а в ерліфтних біореакторах для аерації і перемішування використовують газ (зазвичай повітря), який подається під тиском через розпилювач в дні посудини. При цьому в повному обсязі відбувається безперервна циркуляція рідкого середовища. Барботажні колони (*Рис 5.1 (Б)*) схожі з ерліфтними реакторами, але їх недоліком є відсутність циркуляції культурального середовища.

Інтенсивного перемішування і аерації досягають при використанні газу для забезпечення циркуляції вмісту ферментера через зовнішню або внутрішню трубу, причому в конструкції відсутні обертові частини. Такі ерліфтні ферментери прості за конструкцією і в управлінні, споживають мало енергії, а тому особливо зручні для ведення великомасштабних процесів.

Ерліфтні біореактори, більш ефективні, ніж барботажні колони. Особливо в разі суспензій мікроорганізмів з великою щільністю або в'язкістю. Перемішування в них більш ефективно і проблема злипання пухирців не настільки велика.

Великий інтерес представляють реактори ерліфтного типу. Принцип роботи такого реактора заснований на різниці щільності аерованого і неаерованного стовпів рідини в реакторі, що складається з двох сполучених посудин.



**Рис. 5.1.** Різні типи біореакторів (спрощена схема). А. Реактор з механічним перемішуванням. Б. Барботажна колона. В. Ерліфтний реактор з внутрішньою рециркуляцією. Г. Ерліфтний реактор з зовнішньою системою рециркуляції [42].

Ерліфтні біореактори бувають двох основних типів. У першому випадку реактор являє собою одну ємність з центральною трубкою, яка забезпечує циркуляцію рідини (реактори з внутрішньою рециркуляцією (Рис 5.1 (В))). У другому культуральне середовище проходить через окремі, незалежні

канали (реактор із зовнішнім рециркуляцією (Рис 5.1 (Г))). Конструкція ерліфтних реакторів з внутрішньою рециркуляцією простіша, але якщо вже реактор побудований, його обсяг і швидкість циркуляції залишаються незмінними. Навпаки, біореактор з зовнішньої рециркуляцією можна модифікувати і створювати різні умови ферментації [42].

Висновок:

отже, зважаючи на те, що *Blakeslea trispora* – міцеліальний гриб, через що є небезпека механічного пошкодження та втрати кількості цільового продукту я б обрала аерліфтний ферментер з внутрішньою циркуляцією, але враховуючи економічну вигідність, обираю ферментер з механічною лопатевою лішалкою.

### **5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.**

Продуцент *Blakeslea trispora* відноситься до аеробних еукаріотичних мікроорганізмів тож необхідно забезпечити високу концентрацію кисню у культуральній рідині для синтезу цільового продукту - каротиноїда на кожній стадії виробництва, що пов'язана з культивуванням. Для підготовки повітря його забирають через повітрезабірну шахту висотою 30 м, аби повітря було максимально чистим, далі подається на фільтри грубої очистки де звільняється від великих часточок (ступ. очищення 80 %) такий відсоток очищення може дати фільтр з грубим базальтовим волокном чи з тканиною Камінської, тож на даному етапі обираємо тканину Камінської, далі повітря під дією компресора стискається і подається переохолодження задля видалення зайвої вологи на краплеловлювач після воно подається на ресивер, щоб урівноважити його швидкість і звільнити від ривкової подачі, це необхідно для ефективної фільтрації повітря. Після цього воно подається на фільтри другого і третього ступенів очистки де очищається на 98 % такий ступінь очистки можуть дати фільтр Петрянова, або фторопластовий фільтр високого тиску. Обираємо фільтр фторопластовий, оскільки він дає досить високий ступінь очистки та може забезпечити стабільну роботу після температурної обробки чи обробки паром та витримує досить високі тиски, що необхідно при подачі аераційного повітря. Перед ферментером повітря охолоджується до температури 30-40 °С,

аби не мати негативного впливу на культуру і проходить через його індивідуальний фільтр. Для даної задачі обираємо індивідуальний картриджний фторопластовий фільтр з діаметром пор 0,25 мкм типу ФСВ-М-60 [43, 44].

**Очищення відпрацьованого повітря:** Після проходження ферментерів відпрацьоване повітря подається на аналогічного типу фільтри, де доочищується та знезаражується. Після цього викидається в атмосферу [45].

### **5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів**

Дезінфекція – комплекс заходів (дезінсекція, дератизація) щодо знищення у середовищі життєдіяльності людини збудників інфекційних хвороб (дезінфекція) та їх переносників – комах (дезінсекція) і гризунів (дератизація).

Дезінфекція широко застосовується у фармацевтичному виробництві з метою знищення контамінуючої мікрофлори, підвищення виходу напів- та цільових продуктів і подовження терміну їх зберігання.

При проведенні дезінфекції використовують такі основні методи: фізичний, хімічний та комбінований, за якого фізичні і хімічні методи знезаражування застосуються одночасно.

Повітря будемо знезаражувати фізичним способом, а саме УФ-лампами, встановленими на стелі, кожного робочого дня під час перерви. Виробниче приміщення: підлогу, стіни, стелю, двері та вікна оброблятимемо хімічним способом - пролонгованими дезінфікуючими засобами, оскільки вони мають властивість зберігати свою дію деякий час. Ферментаційне обладнання також хімічним способом, але не пролонгованими засобами, оскільки дезінфекція повинна проводитися перед кожним виробничим циклом. Дезінфекція хімічним методом приміщення та обладнання виконується способом протирання спецперсоналом, який має бути захищений масками (респіраторами), рукавичками та халатом (хімкостюмом) від негативної дії на здоров'я людини дезінфекторів.

Для обробки поверхонь виробничого приміщення обираємо дезінфекційний засіб «Гембар», який був вибраний з «Державного реєстру дезінфекційних засобів України 2020 р.» [45].

Дезінфекційний засіб «Гембар», виготовлений згідно з ТУ У 24.2-21643506.002-01. Свідоцтво про реєстрацію №000821 від 17.05.2011 р. Висновок державної санітарно-епідеміологічної експертизи №05.03.02-4/49244 від 17.05.2011 р., діючими речовинами якого є гуанідинова полімерна сполука, яка є синтетичним аналогом природних гуанідинових сполук.

«Гембар» використовується в цілях дезінфекції в осередках інфекційних хвороб, закладах охорони здоров'я та оздоровчих, дошкільних, навчальних закладах, на комунальних, санітарно-побутових об'єктах, в місцях загального користування, тимчасового проживання та побуті, на підприємствах ресторанного господарства та торгівлі, транспорті, для промислової дезінфекції на підприємствах харчової, переробної, фармацевтичної, парфумерно-косметичної, мікробіологічної, лісової, паперової та інших промисловостей, у сільському господарстві та інших епідемічно значимих об'єктах, діяльність яких пов'язана з виконанням робіт з дезінфекції.

"Гембар" економічний у застосуванні - дезінфекцію поверхонь приміщень (стіни, меблі, устаткування) роблять 1 раз на 7 днів.

Рекомендується обробляти місця з постійним механічним впливом 1 раз на 3 дні.

Дезінфекцію розчинами "Гембара" проводять методами протирання, занурення, замочування і зрошення.

Профілактична, поточна і заключна дезінфекція при кишкових і крапельних інфекціях бактеріальної та вірусної етіології (посуд: із металу, скла, фарфору; пластмаси, іграшки, білизна, поверхні приміщень: з дерева, скла, металу; лінолеуму і кахля, жорсткі меблі, санітарно-технічне обладнання, прибиральний інвентар і пр.).

"Гембар" поставляють у вигляді концентрату в поліетиленових каністрах ємністю 1, 5 і 10 л. Робочі розчини необхідної концентрації готують шляхом розведення водою відміряного кількості концентрату. [46].

Для дезінфекції поверхонь добре час від часу змінювати засіб через резистентність мікроорганізмів. Тому з з «Державного реєстру дезінфекційних засобів України 2020 р.» обираємо ще один засіб - « Дезамін».

Склад засобу, вміст діючих та допоміжних речовин, мас. %: 12,5-17,5 - N-(3 амінопропіл)-N-додецилпропан-1,3- діамін; 25,0 – 30,0 - комплекс амонійно-четвертинних сполук (10,0-11,25 алкілдиметилбензиламоній хлорид; 7,5-8,75 октилдецилдиметиламоній хлорид; 4,5-5,75 дидецилдиметиламоній хлорид; 3,0-4,25 діоктилдиметиламоній хлорид); 3,75- 4,5 етиловий спирт; допоміжні компоненти, інгібітор корозії, вода до 100,0.

Засіб «Дезамін» призначений для проведення профілактичної дезінфекції у лікувально-профілактичних, дитячих та навчальних закладах різних рівнів акредитації, в аптечних закладах (аптечні склади, аптеки, аптечні пункти, аптечні кіоски тощо), на підприємствах фармацевтичної, мікробіологічної, парфюмерно-косметологічної, харчової та переробної промисловості; в оздоровчих закладах (будинки відпочинку, санаторії, профілакторії тощо), у закладах сфери відпочинку і розваг, на комунальних об'єктах (готелі, кемпінги, гуртожитки, сауни, лазні, пральні, хімчистки тощо), на об'єктах комунально-побутового призначення (перукарні, салони краси, манікюрні, педикюрні, косметичні кабінети тощо); в спортивно-оздоровчих комплексах; на рухомому складі та об'єктах забезпечення транспорту (в т.ч. метрополітен), залізничного, автомобільного, авіаційного, морського, річкового транспорту та вокзальній інфраструктурі; у закладах ресторанного господарства і торгівлі; у закладах соціального захисту, хоспісах, будинках для людей похилого віку, в установах пенітенціарної системи, військових частинах; у банківських установах та закладах зв'язку; у місцях громадського користування, на інших епідемічнозначимих об'єктах, діяльність яких вимагає проведення дезінфекційних робіт відповідно до діючих санітарно-гігієнічних та

протиепідемічних норм і правил, нормативно-методичних документів. Докладніше про використання даного засобу можна подивитися в «методичних вказівках щодо застосування дезінфекційного засобу «Дезамін» з метою дезінфекції, передстерилізаційного очищення та стерилізації [47].

Для дезінфекції обладнання використовуємо не пролонгований засіб – кальциновану соду.

Миючі та дезінфікуючі засоби слід застосовувати ті, які нетоксичні для людей, після обробки не мають запаху (особливо якщо він може передаватися продукту), не псують обладнання і ефективні при різних вологості і температурі.

Приготування робочого розчину. Сода кальцинована технічна повинна містити не менше 91% активно діючої речовини. Як дешевий засіб цей препарат незамінний для відмивання поверхонь, забруднених тваринами жирами. Його використовують для миття приміщень і обладнання на м'ясопереробних підприємствах, молочних заводах, тваринницьких фермах, у торговельній мережі, а також транспортних засобів.

Розчини соди (1-2%) дуже ефективні при кип'ятінні в них протягом 1,5-2 год спецодягу, інструментів та інвентарю, інфікованих стійкими споровими збудниками. Щоб приготувати робочий миючий розчин, слід визначити в препараті загальну лужність в перерахунку на кальциновану соду. Для цього в конічну колбу на 200-300 мл вносять 1 г попередньо висушеної при 105-110 ° С соди, додають 50 мл дистильованої води і одну краплю індикатора (0,1% розчину метилового оранжевого). Суміш титрують 0,5 н. розчином соляної кислоти до появи рожево-помаранчевого забарвлення [48].

Процес виробництва лікопіну триває 290 днів на рік. Біосинтез лікопіну має дві стадії культивування для + та – штамів. У виробничому приміщенні встановлений ферментер на 6.3 м<sup>3</sup>, інокулятори 0.6, 0.06, 0.006 м<sup>3</sup>, також у приміщенні знаходяться збірники та реактори змішувачі. Оскільки обладнання багато, беремо ширину підлоги 10 м, враховуючи 1 - 1,5 метри відстані між обладнанням та стінами. Довжину беремо 8 м. Отже площа підлоги (та стелі) =

$10*8=80 \text{ м}^2$ . Висота стін – 5 м (два поверхи), оскільки висота ферментеру 3м 60 см. Отже, загальна площа стін =  $((8*5)+(10*5))*2=180 \text{ м}^2$ . Генеральне прибирання проводиться на початку кожного виробничого циклу. Всього 48 циклів/290 днів. Під час генерального прибирання обробляються підлога та стіни ( $80+180=260 \text{ м}^2$ ). Також генеральне прибирання повинно проводитися кожного 5го дня. Отже,  $290/48=6$ ,  $30/6=5$  прибирань за місяць.  $290/30=9,6$ ,  $9,6*5=48$  прибирання за весь виробничий процес. Припустимо, що площа дезінфекції обладнання на комунікацій становить половину, тоді  $260/2=130 \text{ м}^2$ .

При поточному прибиранні дезінфікуються повітря на підлога два рази на день (Табл. 5.1).

Таблиця 5.1

## Орієнтований розрахунок потреби в дезінфекційних засобах для дезінфекції поверхонь у приміщеннях, обладнання тощо на 2020 рік

№	Найменування підрозділу в об'єкта	Кількість підрозділів	Площа, що підлягає дезінфекції, м <sup>2</sup>		Дезінфекуючий засіб			Кратність обробок			Потреба в деззасобах, л (кг)			
			При поточному прибиранні	При генеральному прибиранні	Назва	Концентрація робочого розчину, %	Норма витрати робочого розчину на м <sup>2</sup>	На добу	На місяць	На рік	На одну обробку		На місяць	На рік
											При поточному прибиранні	При генеральному прибиранні		
1	Стіни, підлога, стеля, вікна, двері	5	80	260	«Гембар»,	0,5	50 мл	2	60	580	4	13	165	1584
					« Дезамін».	0,5	80 мл	2	60	580	6,4	20,8	246	2534,4
2	Обладнання і комунікації	2	-	130	Кальцинована сода	2	50 мл	2	60	580	–	6,5	32,5	312

#### 5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

##### Для підготовки інокуляту у колбах на качалках

Для підготовки посівного матеріалу та виробничого біосинтезу лікопіну використовується середовище складу (г/л):

Крохмаль кукурудзяний – 50;

Соєве борошно– 25;

Бавовняна олія – 40;

$\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 1,5;

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,5;

Тіамін ·  $\text{HCl}$  - 0,002;

pH середовища – 6,5.

Для стерилізації поживного середовища для колб на качалках компоненти поживного середовища необхідно розділити на такі композиції.

**Композиція А:** крохмаль кукурудзяний та соєве борошно (режим стерилізації 112 °C 30 хв). Склад композиції обґрунтовується відсутністю взаємодії між компонентами та їх термолабільністю.

**Композиція Б:** бавовняна олія (стерилізації не підлягає). Склад композиції обґрунтовується відсутністю необхідності стерилізації гідрофобного для звичайних умов субстрату в якому не може розвиватися більшість мікроорганізмів.

**Композиція В:**  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (режим стерилізації 131 °C 40 хв). Склад композиції обґрунтовується термостабільністю компонентів та можливістю взаємодії з сульфатами.

**Композиція Г:**  $\text{MgSO}_4$  (режим стерилізації 131 °C 40 хв). Склад композиції обґрунтовується термостабільністю компонентів та можливістю взаємодії з фосфатами.

**Композиція Д:** тіамін ·  $\text{HCl}$  (режим стерилізації 112 °C). Композиція має стерилізуватися окремо оскільки є досить термолабільною та вноситься у невеликих кількостях.

Композиція Б змішується з іншими при перемішуванні за температури 90 °С при перемішуванні для максимального розчинення компоненту при нестандартних температурних режимах.

Приготування та стерилізації композицій проходить у окремих колбах, а середовище готується у асептичних умовах при змішуванні композицій.

#### **Для підготовки інокуляту у інокуляторах та посівних апаратах**

Для стерилізації поживного середовища для інокуляторів та посівних апаратів компоненти поживного середовища необхідно розділити на такі композиції:

#### **Для інокулятора на 6 та 60 л**

**Композиція А:** крохмаль кукурудзяний та соєве борошно (режим стерилізації 112 °С 30 хв). Склад композиції обґрунтовується відсутністю взаємодії між компонентами та їх термолабільністю.

**Композиція Б:** бавовняна олія (стерилізації не підлягає). Склад композиції обґрунтовується відсутністю необхідності стерилізації гідрофобного для звичайних умов субстрату в якому не може розвиватися більшість мікроорганізмів.

**Композиція В:**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (режим стерилізації 131 °С 40 хв). Склад композиції обґрунтовується термостабільністю компонентів та можливістю взаємодії з сульфатами.

**Композиція Г:**  $\text{MgSO}_4$  (режим стерилізації 131 °С 40 хв). Склад композиції обґрунтовується термостабільністю компонентів та можливістю взаємодії з фосфатами.

**Композиція Д:** тіамін · НСІ (режим стерилізації 112 °С). Композиція має стерилізуватися окремо оскільки є досить термолабільною та вноситься у невеликих кількостях.

#### **Для посівних апаратів на 63 та 630 л**

**Композиція А:** крохмаль кукурудзяний, соєве борошно (режим стерилізації 112 °С 30 хв). Склад композиції обґрунтовується відсутністю взаємодії між

компонентами та їх термолабільністю. Композиція готується та стерилізується у збірнику-стерилізаторі.

**Композиція Б:** бавовняна олія (стерилізації не підлягає). Склад композиції обґрунтовується відсутністю необхідності стерилізації гідрофобного для звичайних умов субстрату в якому не може розвиватися більшість мікроорганізмів.

**Композиція В:**  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (режим стерилізації 131 °С 40 хв). Склад композиції обґрунтовується термостабільністю компонентів та можливістю взаємодії з сульфатами. Композиція готується у вигляді концентрату в окремій колбі.

**Композиція Г:**  $\text{MgSO}_4$  (режим стерилізації 131 °С 40 хв). Склад композиції обґрунтовується термостабільністю компонентів та можливістю взаємодії з фосфатами. Композиція готується у вигляді концентрату в окремій колбі.

**Композиція Д:** тіамін ·  $\text{HCl}$  (режим стерилізації 112 °С). Композиція має стерилізуватися окремо оскільки є досить термолабільною та вноситься у невеликих кількостях.

Композиція готується та стерилізується у окремій колбі.

Композиція Б змішується з іншими при перемішуванні за температури 90 °С при перемішуванні для максимального розчинення компоненту при нестандартних температурних режимах.

Змішування композицій проходить у посівних апаратах[45].

### Для виробничого біосинтезу

Оскільки кількість поживного середовища для виробничого біосинтезу переходить за 3000 л ймовірно більш вигідним і ефективним способом стерилізації буде використання УБС-5 для стерилізації великої кількості поживного середовища для зменшення кількості додаткового обладнання.

**Композиція А:** крохмаль кукурудзяний, соєве борошно,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 4, тіамін- $\text{HCl}$  (режим стерилізації 112 °С 30 хв). Склад композиції обґрунтовується відсутністю взаємодії між компонентами при стерилізації в УБС та відсутністю можливості розкладання компонентів при температурі стерилізації.

**Композиція Б:** бавовняна олія (стерилізації не підлягає). Склад композиції обґрунтовується відсутністю необхідності стерилізації гідрофобного для звичайних умов субстрату в якому не може розвиватися більшість мікроорганізмів.

**Композиція Г:** MgSO<sub>4</sub> (режим стерилізації 131 °С 40 хв). Склад композиції обґрунтовується термостабільністю компонентів та можливістю взаємодії з фосфатами. Композиція готується у вигляді концентрату в окремій колбі.

Змішування композицій проходить у робочому ферментері на 6300 л після стерилізації композицій.

## **5.2. Обґрунтування стадій виділення та очищення цільового продукту**

Цільовим продуктом є лікопін. Лікопін – це каротиноїд, що має загальнозміцнювальну дію на організм і володіє великим набором цінних фармакологічних властивостей. Пригнічуючи в організмі вільнорадикальне окислення, лікопін стабілізує імунний статус організму, поліпшує протікання ряду найважливіших біологічних процесів в організмі, в тому числі нормалізує рівень глюкози в крові, ліпідний обмін, зір і контролює проліферацію (новоутворення) клітин.

Лікарських препаратів на основі лікопіну, як таких, не існує. Лікопін вживається як біологічно активна добавка (БАД).

Було прийнято рішення виробляти не готову лікарську форму, а кристали, які потім підуть на продаж заводам, які спеціалізуються на виробленні лікарської форми з вже готової сировини.

Лікопін міститься в біомасі (ендометаболіт), тому необхідно спочатку відділити цю біомасу від культуральної рідини за допомогою фільтрації.

Оскільки в клітинах залишається багато вологи, яка перешкоджає проникненню неполярного розчинника для екстракції в середину клітин, для збільшення виходу лікопіну біомасу підсушують до вологості не більше 20%. Сушіння може проводитися звичайним періодичним або безперервним способом. Температура сушіння коливається між кімнатною температурою

та 150 °С, переважно вона не повинна перевищувати 60 °С і більш переважно вона повинна бути нижче 50 °С. Час сушіння залежить від використовуваної температури і коливається від 1 години до 72 годин. Внаслідок можливого розкладання цих каротиноїдів шляхом окислення атмосферним киснем, найкраще проводити цю операцію сушіння за відсутності кисню або в атмосфері азоту, або принаймні у вакуумі [50] [51].

Використання в запропонованому способі підсушеної до вмісту вологи не більше 20% біомаси дозволяє екстрагувати лікопін одним неполярним розчинником. Це, по-перше, полегшує процес екстракції, по-друге, дозволяє виключити стадію регенерації етилового спирту або іншого полярного розчинника з водного розчину, що в підсумку призводить до значного зниження питомої витрати біомаси, розчинників і енергоресурсів.

Проводять екстракцію лікопіну неполярним органічним розчинником, наприклад, хладоном-11 при температурі від 20 до 26°С, етилацетатом - від 40 до 65°С. З соняшниковою олією від 80 до 95°С, з попередньо підсушеної до вологості не більше 20% біомаси гриба *Blakeslea trispora* [51]. Час екстракції буде мінімальним, необхідним для розчинення, від 1 секунди до 1 години, переважно від 1 хвилини до 15 хвилин [50]. Кількість використовуваного розчинника залежить від температури та вмісту каротиноїдів у міцелії, коливаючись від 5 мл / г до 30 мл / г біомаси. Кількість екстракцій варіюється від 1 до 3. Кількість витягнутих каротиноїдів перевищує 85%, переважно більше 90% і більш переважно більше 95%. Кількість використовуваного розчинника залежить від температури та вмісту каротиноїдів у міцелії, коливаючись від 5 мл / г до 30 мл / г біомаси. Кількість екстракцій варіюється від 1 до 3. Кількість витягнутих каротиноїдів перевищує 85%, переважно більше 90% і більш переважно більше 95%. Кількість використовуваного розчинника залежить від температури та вмісту каротиноїдів у міцелії, коливаючись від 5 мл / г до 30 мл / г біомаси [50].

Отриманий екстракт, багатий каротиноїдами, повинен бути концентрований до певного обсягу. Кінцева концентрація каротиноїдів у

розчиннику після концентрування переважно становить від 10 до 50 г / л. Температура концентрації повинна бути нижче 80 ° С, переважно нижче 70 ° С і більш переважно нижче 50 ° С. Після того, як екстракт концентрується до необхідного об'єму, його необхідно направити на кристалізацію. Час кристалізації коливається від 15 хв до 24 годин, переважно від 1 год до 12 год і більш переважно від 3 до 8 годин [50].

Відокремлення кристалів від кристалізаційного розчину може бути здійснено фільтруванням або центрифугуванням, витіснивши кристалізаційний розчин, в який кристали занурені, промиванням етанолом. Отримані кристали сушать у вакуумі при кімнатній температурі щонайменше 1 год до отримання залишкового вмісту розчинників, який відповідає вимогам, встановленим законодавством, згаданим раніше, і який у випадку лікопіну передбачає втрати при висиханні менше 0,5% [50].

Отже, стадії виділення на очищення будуть такими:

- 1) Відділення біомаси (лікопін накопичується в біомасі);
- 2) Підсушення біомаси (тому що при використанні неполярних розчинників води повинно бути якнайменше);
- 3) Екстрагування неполярним розчинником;
- 4) Концентрація екстракту;
- 5) Кристалізація;
- 6) Фільтрація кристалів;
- 7) Промивання кристалів органічним розчинником;
- 8) Висушування кристалів;
- 9) Пакування.

#### **5.2.1. Вибір способу відокремлення біомаси та відповідного обладнання**

У промислових умовах застосовують різноманітні, часто досить складні за конструкцією фільтри, причому фільтрувальна перегородка зазвичай має плоску або циліндричну форму.

Одним з інтенсивних методів є відцентрове осадження, що здійснюється в центрифугах. Ці апарати широко застосовуються в різних галузях промисловості. Обладнання для механічної очистки вологих дисперсних матеріалів для розділення неоднорідних систем, що складаються з двох або більш фаз.

1) *Центрифуги* можуть бути періодичної або безперервної дії; горизонтальними, вертикальними або похилими; розрізняються за розташуванням вала в просторі; за способом вивантаження з ротора; герметизованого або негерметизованого виконання. Залежно від виконання в центрифугах затримується 50-90% твердої фази.

Недоліками центрифуг є більш високі витрати на електроенергію, реагенти, профілактичний і капітальний ремонт. При чому ці витрати значно більші за переваги їх використання.

Велику складність представляє ремонт шнека центрифуг. Провести якісний ремонт (напилення або приварювання зносостійкого покриття, балансування) шнека центрифуги в умовах ремонтного цеху експлуатуючого підприємства практично неможливо, тому ремонтні роботи проводяться на заводі виробника або на його ремонтній базі. Оскільки основна маса якісних центрифуг для зневоднення осадів стічних вод проводиться за кордоном, ремонтні роботи пов'язані з тривалими термінами простою обладнання. Вартість ремонту шнека центрифуги може досягати 25 – 40% від вартості самої центрифуги і проводиться один раз в два – три роки [52] [53].

2) Розрізняють *вакуум - фільтри* періодичної дії (листові, патронні,) та безперервної дії (барабанні з зовнішньою та внутрішньою фільтруючою поверхнею, дискові, стрічкові, тарілчасті та інші). Найбільш поширені вакуум - фільтри безперервної дії [53] [54].

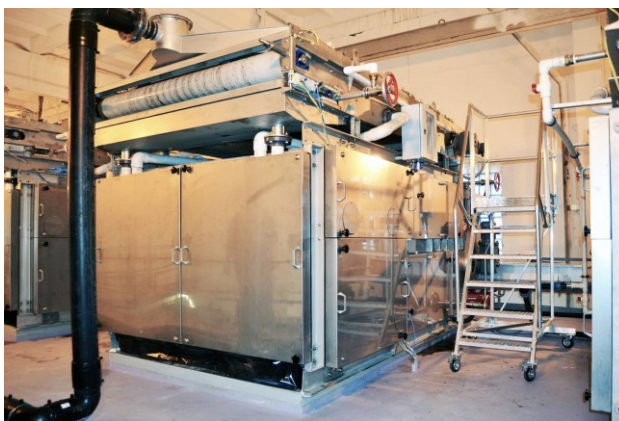
3) Принциповою перевагою *камерних фільтр-пресів* є можливість отримання фільтраційного осаду значно більш низької вологості, ніж на інших типах обладнання для зневоднення – до 65-70%. Економічний ефект

від скорочення витрат на випарювання води, що міститься в фільтраційному осаді, перевищує збільшення витрат на більш витратну реагентну обробку.

За електроспоживанням камерні фільтр-преси займають позицію між стрічковими фільтр-пресами і центрифугами. При цьому, основним споживачем є насосна станція подачі осаду на фільтр-прес. В якості витратних матеріалів виступають фільтрувальні серветки, які при налагодженій технології регенерації вимагають заміни раз в 2 роки.

Витрати на поточне обслуговування агрегатів порівнянні. Реально до 3-х одиниць фільтр-пресів або центрифуг може обслуговувати один оператор, проте за нормами потрібно мінімум дві людини. Однією з найбільш часто повторюваних процедур технічного обслуговування стрічкових фільтр-пресів є змащування підшипникових вузлів. Дана операція повторюється один раз у 3 – 6 тижнів і виконується слюсарем не високого розряду. Змащення вузлів центрифуг проводиться рідше (раз в 2 – 3 місяці), але повинна виконуватися персоналом більш високої кваліфікації [53] [54].

4) Перевагами застосування *стрічкових фільтр-пресів (Рис. 5.2)* є висока продуктивність, особливо відчутна при роботі з осадами з високою часткою осадів первинних відстійників, низька енергоємність і досить низькі витрати на обслуговування та ремонт.



**Рис 5.2. Стрічковий фільтр-прес**

Основним витратним матеріалом на стрічкових фільтр-пресах є ситові стрічки і манжети підшипників, необхідність заміни яких виникає один раз в 1,5 – 3 роки. Ремонт валів (відновлення поліуретанового покриття) може

знадобитися раз в 6 – 10 років. Важливою перевагою є оперативність ремонтних робіт. Заміна ситових стрічок займає 1 – 2 години робочого часу, заміна манжет 2 – 3 робочих дні, ремонт вала – не більше двох тижнів [53][54].

На стадії відфільтровування біомаси від культуральної рідини обираємо стрічковий фільтр-прес, оскільки він високопродуктивний та легкий в технічному обслуговуванні.

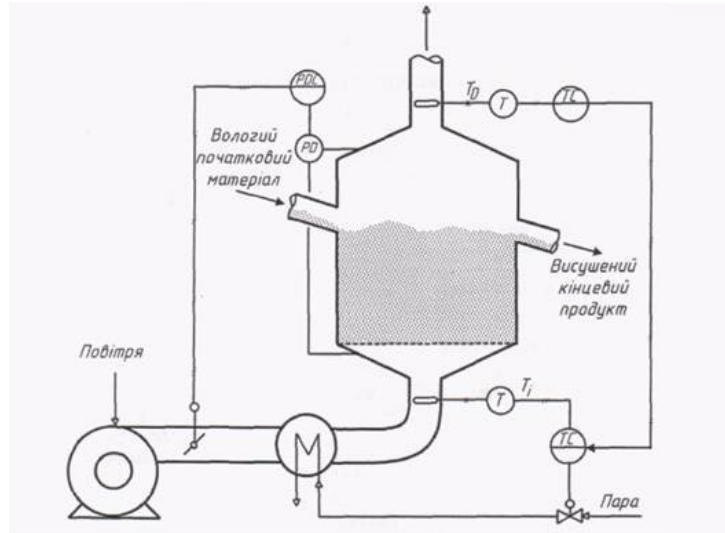
### **5.2.2. Вибір способу підсушування біомаси.**

Оскільки для даного проекту збереження цілісності біомаси не є необхідним, в принципі, для початкового висушування до 20 % вологості можна використовувати будь-який зручний спосіб сушіння.

1) *Аерофонтанні* сушарки. Для сушіння зернистих незлипаючихся, вологих і досить великих матеріалів в підвішеному стані застосовуються аерофонтанні сушарки. Це сушарки з вихровим потоком, в якому відбувається закручена циркуляція самого матеріалу, що висушується. При такій формі камери швидкість газу внизу камери перевищує швидкість осадження найкрупніших частинок, а вгорі - менше швидкості осадження найдрібніших частинок. У зазначеному випадку досягається більш організована циркуляція твердих частинок, які піднімаються в центрі і опускаються у периферії апарату. Завдяки зниженню швидкості газів у міру їх підйому поліпшується розподіл часток по крупності і зменшується унос пилу. Це, у свою чергу, підвищує рівномірність нагріву (більш дрібні частинки, що піднімаються вище, знаходяться в області більш низьких температур) і дозволяє зменшити висоту камери. У сушильній камері відбувається інтенсивне перемішування матеріалу, оскільки він знаходиться в підвішеному стані. З камери висушуваний матеріал потоком газу захоплюється в циклон 3, де матеріал відділяється від газу.

Основний недолік аерофонтанних сушарок - нерівномірність сушки. Більш рівномірна сушка досягається в сушарках з киплячим шаром [54].

3) Застосування псевдорозрідження (Рис. 5.3) передбачає наявність механічних пристроїв, інтенсифікаторів технологічних процесів і дозволяє одержати високу якість кінцевих продуктів і створити санітарно-гігієнічні умови виробництва.



**Рис. 5.3. Схема сушарки з псевдорозрідженим шаром**

Поряд з цим псевдорозрідження має свої недоліки, до яких можна віднести можливість одержання агломератів, а також злипання часток.

Сушарки з псевдорозрідженим шаром можна регулювати двома способами: для отримання заданої вологості кінцевого продукту можна змінювати або кількість підведеного тепла або витрату початкової сировини. Якщо температуру на вході підтримувати постійною, то для певної вологості навколишнього середовища величина буде постійною. Тоді, змінюючи витрату початкової сировини, регулятор може підтримувати постійним значення температури.

На практиці регулювання вологості кінцевого продукту рідко здійснюють зміною витрати початкової сировини. Через складність транспортування вологого твердого матеріалу можливе повне припинення його подачі. Якщо в процесі регулювання відбудеться повне припинення подачі початкової сировини, то для запобігання пересушування кінцевого продукту необхідно негайно зменшити підведення тепла [54] [55].

2) *Вакуумні сушарки (Рис. 5.4)* внаслідок складності і дорожнечі мають порівняно обмежене застосування і зустрічаються головним чином у хімічній промисловості.

Перевагою вакуум–сушарок у порівнянні з конвективними атмосферними сушарками є більш інтенсивне сушіння при низьких температурах, що важливо для речовин, які не витримують високої температури (термолабільних).

Вакуумне сушіння вимагає меншої витрати теплоти внаслідок (майже) відсутності втрат з повітрям, що викидається з сушарки. Перевагою вакуум–сушарок є стерильність середовища. Герметичність сушильної камери дає гарантію проти забруднення продукту пилом з навколишнього середовища й окислювання його киснем повітря. Вакуумне сушіння дозволяє також виключити виділення з матеріалу шкідливих парів і газів у навколишнє середовище, що особливо важливо при сушінні отруйних речовин.



**Рис. 5.4. Вакуумна сушильна шафа**

При сушінні під вакуумом є можливість більш повного вловлювання цінних чи шкідливих парів. Замість дорогої абсорбційної установки, що застосовується для поглинання таких парів при атмосферному сушінні, у вакуум–сушарці застосовується більш дешевий і радикальний засіб

вловлювання парів шляхом конденсації (до 95% таких летких розчинників, як етиловий спирт, ацетон тощо). Нарешті, при вакуумному сушінні менші втрати продукту й у вигляді пилу і менша пожежна небезпека [54] [55].

До недоліків сушіння під вакуумом варто віднести високу вартість сушильного агрегату внаслідок складності його конструкції і наявності спеціальної конденсаційної установки та труднощі контролю процесу сушіння під час роботи сушарки, тому що відкривання люків сушарки порушує вакуум. Незважаючи на ряд переваг, вакуум–сушарки через їх складність застосовуються тільки в тих випадках, коли це викликано технологічними особливостями обробки матеріалу, що висушується [55].

Обираємо вакуумну сушарку для першого сушіння до 20 % вологості, оскільки можливе розкладання каротиноїдів шляхом окислення атмосферним киснем [50].

### **5.2.3. Вибір способу виділення цільового продукту з біомаси. Екстракція.**

**Екстракція** (лат. *extractio* < лат. *extragere* — витягувати, добувати) — процес добування однієї або кількох речовин (компонентів) зі складних систем (рідких або твердих) селективним розчинником, який називається екстрагентом [55].

Екстракція лікопіну може проводитися лише неполярними органічними розчинниками [50].

1) У *хладона-11* низька температура кипіння. Тобто він закипає при кімнатній температурі, його треба весь час охолоджувати, буде потреба у герметичному обладнанні та, в цілому, негативно впливає на здоров'я працівників. Також має найвищу озонруйнуючу активність, тому його виробництво та використання обмежено Монреальським протоколом.

2) Використовуючи *рослинну олію* як екстрагент, треба розуміти, що виникне багато незручностей в роботі з обладнанням, точніше з подальшим його миттям, та на етапі кристалізації, оскільки виникне потреба в більшій кількості стадій.

3) *Етилацетат* (Рис 5.5) - його перевага серед інших розчинників пов'язана з невисокою ціною, малою токсичністю і цілком прийнятним запахом. Також має досить високу розчинність каротиноїдних компонентів. Етилацетат включений до розчинників групи III класу ІСН. Ці розчинники допустимі як на національному рівні, так і на рівні громад, у фармацевтичній та харчовій галузях (RDL12 / 04/90 та RDL16 / 10/96) [50].



**Рис. 5.5. Етилацетат**

Також для екстракції лікопіну етилацетату потрібно менше, ніж інших розчинників, оскільки лікопін в етилацетаті краще розчиняється (Табл. 5.2).

Таблиця 5.2.

**Порівняння потрібної кількості кожного екстрагенту для процесу екстракції лікопіну [51]**

<b>Екстракція</b>	<b>Масло</b>	<b>Етилацетат</b>	<b>Хладон-11</b>
Температура	95	65	20
Співвідношення Біомаса/екстрагент	1:4	1:2,5	1:16

Екстракція буде проводитися в екстракторі з мішалкою та сорочкою відповідного об'єму [51].

**5.2.4. Вибір способу концентрації органічного екстракту. Випарювання.**

У харчовій промисловості набули поширення різноманітні випарні апарати, що пояснюється великим діапазоном властивостей початкових розчинів і кінцевих продуктів, різними умовами проведення процесу

випарювання, широким інтервалом продуктивності. Випарні апарати можна класифікувати за методами обігрівання, компонованням і конструкцією поверхні нагріву за розміщенням робочих середовищ, режимом роботи, кратністю циркуляції розчину і т. ін [54].

У харчовій промисловості випарні апарати обігриваються здебільшого водяною парою. Парове обігривання відрізняється гнучкістю регулювання, високими коефіцієнтами теплопередачі, а водяна пара - високою енергоємністю. В малих випарних апаратах і лабораторних установках практикують електрообігривання. Трубчаста поверхня теплообміну може бути: вертикальною, горизонтальною, рідко, нахиленою; із вбудованою нагрівальною камерою і з винесеною. За розміщенням робочих середовищ випарні апарати поділяють на апарати з подаванням нагрівної пари в труби (кипіння розчину у великому об'ємі) і з подаванням пари в міжтрубний простір (кипіння розчину в трубах). За режимом руху киплячої рідини випарні апарати бувають з природною і вимушеною, з одноразовою і багаторазовою циркуляцією рідини, плівкові.

Кожний випарний апарат складається з двох основних елементів: нагрівальної камери - теплообмінника, що забезпечує передачу теплоти від теплоносія до випарюваного розчину крізь поверхню теплопередачі, паросепаратора -- парового (надсокового) простору, в якому вторинна пара відділяється від киплячого розчину.

Найпоширенішими є *випарні апарати з вертикальними трубчастими нагрівальними камерами (Рис. 5.6)*. Вони відносно компактні, у них забезпечуються сприятливі умови теплопередачі. В апаратах цього типу випарюваний розчин міститься в трубах, а нагрівна пара – в міжтрубному просторі, що дає змогу порівняно легко видаляти відклади накип з поверхні

Рис. IX.1. Схеми випарного апарата з нагрівальними камерами:

*a* – оболонковою; *б* – трубчастою; *1* – паросепаративний простір; *2* – нагрівальна камера;  $S_n, S_x$  – витрати відповідно початкового і кінцевого розчинів;  $x_n, x_x$  – концентрації сухих речовин відповідно у початковому і кінцевому розчинах; *D* – нагрівна пара; *W* – вторинна пара; *K* – конденсат нагрівної пари

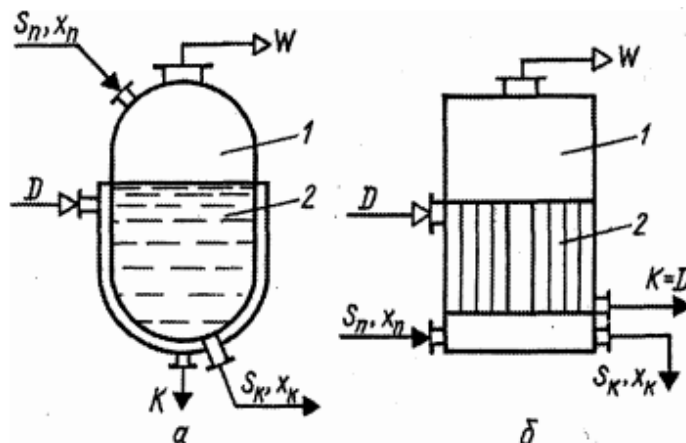


Рис. 5.6. Схеми випарного апарата з нагрівальними камерами [54]

## Кристалізація

Кристалізацію можна здійснювати:

1. Додаванням речовин, які зменшують концентрацію екстрагенту (наприклад, розбавлення водою);
2. Охолодженням.

При охолодженні розчинність речовин зменшується. Додавання води до етилацетату є неможливим, через те що ці дві речовини не змішуються, тому пропонується використовувати охолодження. При охолодженні до температури  $18^{\circ}\text{C}$  починається первинна кристалізація, тобто утворюється маточний розчин, а потім при зниженні ще до  $4^{\circ}\text{C}$  починають формуватись на маточних кристалах кристали лікопіну. Такий прийом повинен тривати впродовж 1 доби і це, в свою чергу, призводить до росту кристалів, які потім легко відділяються від рідкої фази.

В якості обладнання для кристалізації обираємо кристалізатор, обладнаний якірною мішалкою і сорочкою охолодження, в яку подається холодна вода.

## Фільтрація кристалів лікопіну

1) Барабанні фільтри найбільш широко використовуються у промисловості. Розглянемо барабанний вакуум-фільтр із зовнішньою поверхнею фільтрування.

Фільтр являє собою горизонтальний циліндричний перфорований барабан, покритий ззовні фільтрувальною тканиною. Барабан обертається навколо своєї осі і на 0,3-0,4 поверхні занурений у суспензію, яка міститься в ємності. Всередині барабан розділений радіальними герметичними перегородками на окремі комірки, з'єднані трубками з розподільною головкою.

До переваг барабанних вакуум-фільтрів відносяться: безперервність дій, універсальність, тобто придатність для розділення різноманітних суспензій; можливість виготовлення з корозійностійких матеріалів, легкість обслуговування.

В той самий час, фільтри мають наступні недоліки: невелика площа фільтрування та порівняно значна вартість; труднощі ретельного промивання та осушування осаду; віддаленість розподільної головки від поверхні фільтрування, що приводить до затримки фільтрату та промивних вод всередині барабана і ускладнює їх окреме відведення.

2) *Стрічковий вакуум-фільтр* використовується для розділення суспензій, що утворюють неоднорідний за розмірами частинок тяжкий осад, який необхідно промивати. Фільтр являє собою стіл, на якому закріплені відкриті зверху вакуум-камери.

До переваг стрічкових фільтрів слід віднести: простоту конструкції порівняно з багатьма іншими фільтрами неперервної дії, чітке розділення фільтрату і промивної води, можливість протитечійного промивання осаду.

До їх недоліків відносяться: невелика поверхня фільтрування порівняно з площею приміщень, яку вони займають, і наявність зон на фільтрувальній перегородці, які не використовуються для фільтрування.

3) *НУТЧ-фільтри*. Фільтр являє собою прямокутний або циліндричний відкритий апарат з фільтрувальною перегородкою, розміщеною дещо вище

його днища на перфорованій решітці (Рис. 5.7). Після заповнення фільтра суспензією та створення вакууму фільтрат проходить через перегородку, а осад затримується на ній. Після фільтрування осад промивають (якщо це необхідно) і видаляють із фільтра зверху ручним способом.

Переваги відкритих НУТЧ-фільтрів: можливість добре промити осад; легкість захисту від корозії; простота й надійність конструкції.

Недоліки фільтрів: невелика швидкість фільтрування внаслідок того, що різниця тисків практично не перевищує 0,75 ат; громіздкість установки; ручне вивантаження осаду.



**Рис. 5.7. НУТЧ-фільтр**

В деяких конструкціях вивантаження осаду значно полегшується та прискорюється за рахунок того, що апарат має відкидне днище, яке кріпиться до корпусу фільтра на болтах і відкидається на шарнірі.

Зважаючи на те, що кількість кристалів невелика (приблизно 2 – 3 кг), то треба обрати фільтруючу установку низької потужності, тобто, НУТЧ-фільтр.

### **Промивання готових кристалів лікопіну**

По закінченню фільтрування кристали промиваються переохолодженим стиртом у тому ж НУТЧ-фільтрі. Потім вручну знімаються і передаються на висушування.

### **5.2.5. Вибір способу сушіння та сушарки.**

1) Перевагою *розпилюючих сушарок* є швидкість процесу сушіння, низька температура матеріалу при сушінні, отримання продукту у вигляді дрібного порошку, який не потребує подальшого подрібнення також він є добре розчинним. Температура матеріалу на протязі періода сушки не перевищує температури випарюваної вологи (60 – 70 °С) и залишається нижче температури сушильного агенту.

Недоліком є порівняно великі розміри сушильної камери внаслідок невеликої швидкості руху сушильного агента і невеликої напруги камери по випарній волозі (до 2 – 25 кг/(м<sup>3</sup>год)), а також складність механізмів розпилення і системи пиловловлювача і розвантаження.

2) *Вакуум-сушильна шафа* (Рис. 5.8). Сушарка працює в періодичному режимі і являє собою шафу циліндричної або прямокутної форми та закривається герметично.

Для зниження втрат теплоти корпус і кришку вакуум-сушильної шафи теплоізолюють. При подачі теплоносія в плити матеріал, що висушується, на полицях нагрівається й з нього випаровується волога. Для зниження температури сушіння процес проводять під вакуумом, пари вологи відводять у конденсатор. При необхідності в процесі сушіння шар матеріалу, що висушується, періодично перемішують.



**Рис. 5.8. Вакуум-сушильна шафа**

Перевагою вакуумних сушарок є можливість сушіння матеріалів при невисоких температурах, менша витрата тепла, можливість уловлювання пари цінних компонентів (наприклад, пари спиртів та органічних рідин), кращі санітарні та безпечні умови роботи обслуговуючого персоналу. Недоліками таких сушарок є низька продуктивність, необхідність застосування ручної праці, більші витрати часу на сушіння, завантаження й вивантаження матеріалу.

Для остаточної сушки кристалів лікопіну обираємо вакуумну сушарку, тому що робота з готовим продуктом потребує більшої обережності та мінімалізації втрат.

### **Фасування**

Серед чинників, що забезпечують збереженість лікопіну, найбільш важливими є температура і вид упаковки. Лікопін має зберігатися в сухому, прохолодному місці, тому упаковка має бути вологонепроникною.

Відомо, що на 15-20 добу зберігання склад атмосфери всередині упаковок стабілізується. В поліетиленових пакетах товщиною плівки 60 мк із лікопіном під час зберігання у холодильній камері вміст вуглекислого газу складав 2,9 %, кисню 14,1 %, в неохолоджених сховищах – 4,4 і 11,2 %, тобто бажано використовувати тришарову плівку [50].

Одним із показників якості лікопіну є забарвлення. При попаданні сонячних променів на лікопін, він може розпадатися та міняти свій колір, тому упаковка повинна бути металізована фольгою [50].

Отже, фасується отриманий лікопін у вологонепроникні металізовані тришарові поліетиленові упаковки (Рис. 5.9).



**Рис. 5.9. Металізований пакет**

### 5.3. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

1. Обґрунтовано вибір таких післяферментаційних стадій:

#### 1) Зберігання культуральної рідини

- 2) Відділення біомаси (лікопін накопичується в біомасі);
- 3) Підсушення біомаси (тому що при використанні неполярних розчинників води повинно бути якнайменше);
- 4) Екстрагування неполярним розчинником;
- 5) Концентрація органічного екстракту;
- 6) Кристалізація;
- 7) Фільтрація кристалів;
- 8) Промивання кристалів органічним розчинником;
- 9) Висушування кристалів;
- 10) Пакування.

*Вихідні дані:*

- а. об'єм культуральної рідини з однієї ферментації –  $V_{кр} = 3,6 \text{ м}^3$ ;
- б. Концентрація цільового продукту у КР  $C_{ант} = 1,3 \text{ г/л} (=1,3 \text{ кг/м}^3)$ ;
- с. Концентрація біомаси у КР  $C_{БМ} = 45 \text{ г/л} (=45 \text{ кг/м}^3)$ ;
- д. Втрати на стадіях виділення цільового продукту складають 25%:

початкова кількість цільового продукту, яка поступає з КР складає  $3,6 \text{ м}^3 \times 1,3 \text{ кг/м}^3 = 4,68 \text{ кг}$ ; кінцева кількість (з урахуванням 25 % втрат) має становити 3,5 кг.

Розподіл втрат по стадіях та підбір необхідного обладнання наведено у таблиці 5.3.

## Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати, (Разом 25 %)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
<b>ТП 6 Зберігання культуральної рідини</b>						
1	ТП 6.1. Зберігання культуральної рідини	КР	3,6 м <sup>3</sup> (3600 л)	-	3,6 м <sup>3</sup> (3600 л)	Збірник КР 6,3 м <sup>3</sup>
<b>ТП 7. Відділення біомаси</b>						
2	ТП 7.1. Фільтрування стрічковим фільтр-пресом	Біомаса	162 кг (3,6×45)- АСБ, з врахуванням 60% вологості 259,2 кг	12,96 кг (5%)	246,24 кг	Фільтр-прес продуктивністю 3 м <sup>3</sup> /год
		Фільтрат	3353,76 л (3600- 246,24)	-	3353,76 л	Збірник фільтрату об'ємом 4 м <sup>3</sup>
<b>ТП 8. Сушіння біомаси</b>						
3	ТП 8.1. Сушіння у Вакуумній сушильній шафі	Вологий осад біомаси (вологість 60%)	246,24 кг, враховуючи 20% вологи - 82,08 кг	0,78 кг (1%)	81,3 кг	Вакуумна сушка місткістю 100 кг

1	2	3	4	5	6	7
<b>ТП 9. Виділення цільового продукту</b>						
4	ТП 9.1 Екстракція цільового продукту	Етилацетат (співвідношення біомаси до екстрагенту 1:2,5)	203,25 (81,3×2,5)	-	-	Екстрактор з мішалкою та сорочкою об'ємом 400 л
		Екстракційна суміш			284,55 л (81,3+203,25)	
5	ТП 9.2. Розділення фаз	Екстракційна суміш	284,55 л	-	-	
		Органічний екстракт	-		256 л	Передається одразу на концентрацію.
		Детрит клітин і рештки водорозчинних компонентів	-	28,55 л (10%)		Переносна ємність об'ємом 30 л
<b>ТП 10. Концентрація цільового продукту</b>						
6	ТП 10.1. Випарювання	Органічний екстракт	256 л. Мінус 50% вологи: 128 л.	1 л (1%)	127	Вакуум-випарний апарат з вертикальними трубчастими нагрівальними камерами продуктивністю 250 л
<b>ТП 11. Кристалізація цільового продукту</b>						

7	ТП 11.1. Кристалізація	Органічний екстракт	127	7 л (5,5%)	120 л	Кристалізатор, обладнаний якірною мішалкою і сорочкою охолодження об'ємом 200 л
<b>ТП 12. Фільтрація кристалів цільового продукту</b>						
8	ТП 12.1. Фільтрація кристалів цільового продукту	Органічний екстракт	120 л	-		НУТЧ-фільтр продуктивністю 100 л.
		Кристали	3,62 кг (1,3*3,6)- 22,5 % втрат з попередніх стадій	0,1 (2%)	3,54 кг	На промивання
		Фільтрат			216,5л (241-3,54)	На утилізацію
<b>ТП 13. Промивання кристалів</b>						
7	ТП 13.1. Промивання кристалів	Етанол (співвідношення кристалів до етанолу 1:10)	35 л (3,5*10)	-		НУТЧ-фільтр продуктивністю 100 л.
		Суміш етилену та кристалів	-	-	38,5 л	
<b>ТП 14. Сушіння цільового продукту</b>						
9	ТП 14.1. Сушіння кристалів лікопіну у вакуумній сушарці	Вологі кристали (вологість 10 %)	3,54 кг			Вакуумна сушка продуктивністю 5 кг
		Висушені кристали	-	(0,5 %)	3,52 кг	Пересувна ємність об'ємом 4 л

		(вологість 5%)				
<b>ПМВ 15. Пакування, маркування, відвантаження</b>						
10	ПМВ 15.1. Фасування, пакування, маркування кристалів лікопіну	Висушені кристали (вологість 5%)	3,52 кг	-	-	Робоча поверхня для пакування кристалів лікопіну вручну у вологонепроникні металізовані тришарові поліетиленові упаковки
		Упаковки по 50 г	-		3,52 кг = 70 пакетиків по 50 г.	

## РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання наведеного на апаратурній схемі розписана у таблиці 6.1.

Таблиця 6.1

**Специфікація обладнання для апаратурної схеми виробничого біосинтезу та допоміжних робіт біосинтезу, а також для апаратурної схеми виділення та очистки лікопіну**

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика(виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Повітрязабірник обладнаний металевою сіткою для видалення великих частинок[43]
Ф-2	Фільтр грубої очистки	1	Фільтр повітряний ВЕНТС ФБК 100 з полімерних волокон фірми «VENTBAZAR» E= 90 %[43]
К-3	Компресор	1	Компресор GX 7 фірми Atlas Copco, потужн 14 л/с, робоч тиск 1 МПа[43]
Т-4	Теплообмінник охолоджувач	1	Теплообмінник-охолоджувач серії AFR 11 «Уралкомпресормаш»[43]
Р-5	Ресивер	1	Ресивер РВ 320/10 «Уралкомпресормаш» [43]
Т-6	Теплообмінник -нагрівач	1	Теплообмінник ВОП_N Airone( Росія)[43]

НУХТ БТЕК 04.02.36 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Гордаш Д. Ю.		
Консультант				
Керівник		Пенчук Ю. М..		
Зав.кафедри		Пирог Т.П.		
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ				
		Літ.	Арк.	Аркшів
			72	140
Кафедра БТМ				

Ф-7	Фільтр тонкої очистки	1	Фільтр моделі ФСВ-М-60 матеріал фторопласт , E=99,996, величина пор 0,25 мкм, робочий тиск бар, 150 °С, продуктивність 3600 м <sup>3</sup> /год. [44].
РЗ-1, РЗ-2, РЗ-5. Р-7, Р-8	Реактор для приготування та стерилізації розчинів титрантів для контролю рН та піногасника та композиції А	5	Реактор на 50 л для приготування розчинів обладнаний мішалкою потужністю 5,65 кВт з рубашкою та електротеном для контролю температури до 100 °С моделі RSM-50[56].
Р-9,	Реактор для приготування композиції А	1	Реактор з емальований хімічний типу «СЕРН» місткістю 630 л[57].
Р-11	Збірник для зберігання бавовняного масла	1	Збірник обладнаний сорочкою та контролем температури «СЕН» місткістю 160 л[58].
Р-13	Реактор для приготування середовища для стерилізації в УБС-5	1	Реактор з емальований хімічний типу «СЕРН» місткістю 4000 л[59].
АФ-19	Ферментер виробничий	1	Ферментер аерліфтний виготовлений на замовлення компанією «LAVAlab Co. Ltd. Місткість 6,3 м <sup>3</sup> фірми [60]
АФ-18	Ферментер- інокулятор	1	Ферментер на 630 л фірми «Біотехно» [61]
АФ-17, АФ-28	Ферментер- інокулятор	2	Ферментер на 63 л фірми «Біотехно» [62]
АФ-16, АФ-29	Ферментер- інокулятор	2	Ферментер на 6 л фірми «Біотехно» [63]
Ф-15 Ф-20 Ф-21 Ф-22 Ф-30, Ф-31	Фільтри індивідуальної очистки	6	Фільтри компанії «Tianjin KTMT Environment Tech Co., Ltd.» термостійкий , температура до 150 °С матеріал- поліпропілен. Пори 0,1 мкм. E=99,999[64]
,Д-21 Д-	Дозатори об'ємно вагові	9	Дозатор об'ємно-ваговий

22, Д-23 Д-24, Д- 25, Д- 26, Д- 27, Д- 28, Д-29			ШД-8М5 [65].
Н-2, Н- 4, Н-6, Н-12,	Насоси перистальтичні	4	Насос відцентровий MS0 фірми ТОВ «Ватерпас» потужністю від до 500 /год [66]
Н-8, Н- 10, Н- 14, Р-29	Насоси відцентрові	3	Насос відцентровий JCP фірми ТОВ «Ватерпас» потужністю від 1 м <sup>3</sup> /год [67]
СІР-32	Станція для автоматичної мийки	1	Станція автоматичної мийки обладнана двома ємностями на 700 л моделі СІР60(2)К. [68]
З-33	Збірник культуральної рідини	1	Збірник об'ємом 6,3 м <sup>3</sup> з мішалкою та сорочкою[69] Діаметр 1,2 м, висота 2,8 м.
Н-34	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий JCP фірми ТОВ «Ватерпас» потужністю від 1 м <sup>3</sup> /год [67]
ФП-35	Фільтр-прес стрічковий	1	Стрічковий фільтр-прес моделі ЛМН-500-1К, ширина стрічки = 500 мм, продуктивність 3-7 м <sup>3</sup> , потужність приводу 0,75 кВт, витрати води = 30-50 л/хв, габарити 4200x1400x2200, маса = 2400 [70].
З-36	Збірник біомаси	1	Збірник об'ємом 250 л на коліщатках [69] Діаметр 0,5 м, висота 1,6 м.
ВСШ-37	Вакуумна сушильна шафа	1	Вакуумна сушильна шафа моделі СВ-100. Продуктивність 100 л/цикл Ширина 700 мм, висота 780, глибина 740 мм[71].
З-38	Збірник біомаси	1	Збірник об'ємом 250 л на коліщатках [69] Діаметр 0,5

			м, висота 1,6 м.
Е-39	Екстрактор	1	Екстрактор з мішалкою, пористою перегородкою та сорочкою об'ємом 400 л Діаметр 0,7 м, висота 1,8 м. [69]
З-40	Збірник для зберігання етилацетату	1	Збірник об'ємом 250 л Діаметр 0,5 м, висота 1,6 м. [69]
З-41	Ємність для органічного екстракту	1	Збірник об'ємом 300 л Діаметр 0,6 м, висота 1,7 м. [69]
ВВУ- 42	Вакуум-випарна установка	1	Вакуум-випарний апарат з вертикальними трубчастими нагрівальними камерами продуктивністю 250 л. ЭСВА -250. Габарити: 2,5x1,8x2,6 [72]
КД-43	Конденсатор	1	Конденсатор фірми С-3,5 ST. Площа теплообміну: 3,5, діаметр 390 мм, висота 1780 мм, маса конденсатора 160 кг [73]
З-44	Збірник сконцентрованого органічного екстракту	1	Збірник об'ємом 150 л Діаметр 0,3 м, висота 1,2 м. [69]
К-45	Кристалізатор	1	Кристалізатор, обладнаний якірною мішалкою і сорочкою охолодження об'ємом 200 л Діаметр 0,4 м, висота 1,5 м. [69]
Н-46	Шестеренний насос	1	Насос шестеренний JCP фірми ТОВ «Ватерпас» потужністю від 50 до 500 л /год [74]
НФ-47	НУТЧ-фільтр	1	НУТЧ-фільтр з рубашкою моделі НФП-0,7-0,001 ПП. Продуктивність 100 л/год Ширина 110 мм довжина 130 мм висота 220 мм [75].
З-48	Збірник для зберігання етанолу	1	Збірник об'ємом 40 л Діаметр 0,3 м, висота 0,6 м.

			[69]
З-49	Ємність для промитих кристалів	1	Збірник об'ємом 4 л Діаметр 0,15 м, висота 0,25 м. [69]
ВСШ-50	Вакуумна сушильна шафа	1	Вакуумна сушильна шафа моделі СВ-5. Продуктивність 5 л/цикл Ширина 125 мм, глибина 175 мм, висота 151 мм[71].
З-51	Ємність для висушених кристалів	1	Збірник об'ємом 4 л Діаметр 0,15 м, висота 0,25 м. [69]
РП-52	Робоча поверхня для пакування	1	Лабораторний стіл металевий. Ширина 150 мм, довжина 70 мм, висота 120 мм [76]

## РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема біосинтезу лікопіну включає допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва, підготовка і стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу і власне біосинтез).

Виділення на очищення лікопіну включає технологічний процес (відділення біомаси, сушіння біомаси, екстрація, кристалізація, фільтрація, промивання кристалів, висушування кристалів лікопіну).

Технологічну схему біосинтезу та виділення лікопіну наведено у графічній частині проекту.

### **ДР 1. Санітарна підготовка виробництва.**

#### ***ДР 1.1. Підготовка мийних та дезинфікуючих засобів.***

*ДР 1.1.1. Приготування мийно-дезінфікуючого розчину кальцинованої соди.*

Робочий розчин кальцинованої соди (2 %) готують в установці СІР-мийка. Для цього зважують за допомогою об'ємно-вагового дозатора кількість каустичної соди та розбавляють водою.

#### *ДР 1.1.2. Приготування мийно-дезінфікуючого розчину «Гембар».*

Зі складу надходить концентрат Гембару (25 %), який розводять водою до потрібної концентрації (0,5 %). Щоб отримати (0,5 %) розчину Гембару, наливають 25% Гембару та розводять водопровідною водою.

#### *ДР 1.1.3. Приготування мийно-дезінфікуючого розчину «Дезамін».*

Зі складу надходить концентрат Дезаміну (17,5 %), який розводять водою до потрібної концентрації (0,5 %). Щоб отримати (0,5 %) розчину Дезаміну, наливають 17,5% Дезаміну та розводять водопровідною водою.

					НУХТ БТЕК 04.02.36 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ		
Розроб.	Гордаш Д. Ю.				Літ.	Арк.	Аркушів
Консультант						77	140
Керівник	Пенчук Ю. М.				Кафедра БТМ		
Зав.кафедри	Пирог Т.П.						

## ***ДР 1.2. Підготовка приміщень.***

### ***ДР 1.2.1. Щоденне прибирання приміщень***

Щоденне прибирання приміщень проводять після кожної зміни вологим способом. Його проводять у виробничих, лабораторних, підсобних і побутових приміщеннях. При проведенні вологого прибирання використовують 0,5 % робочий розчин Гембар(від ДР 1.1.2).

### ***ДР 1.2.2 Генеральне прибирання приміщень.***

Генеральне прибирання проводять раз у місяць 0,5 %-м робочим розчином «Дезамін» (від ДР 1.1.3.). Стіни, двері, стелі, та інші поверхні зрошують з гідропульта 0,5 % розчином Дезаміну з розрахунку 100 мл/м<sup>2</sup>. Після закінчення зрошення приміщення закривають на 30-40 хвилин, після цього вилучають надлишок розчину за допомогою губки. Особливо забруднені місця додатково миють цим же розчином

## ***ДР 1.3. Підготовка обладнання та комунікацій.***

### ***ДР 1.3.1. Миття обладнання***

Для миття ємнісного обладнання використовують станцію СІР – мийки, питну воду і 2 %-й робочий розчин кальцинованої соди (від ДР 1.1.1.).

### ***ДР 1.3.2. Ополіскування обладнання***

Ополіскування здійснюють водою, протягом 30 хвилин, для виключення можливості нанесення шкоди здоров'ю персоналу розчином лугу.

### ***ДР 1.3.3. Технічний огляд***

Перед процесом стерилізації обов'язковим елементом підготовки є перевірка якості проведених робіт для цього як правило проводять технічний огляд та перевірку на герметичність з метою виявлення можливих неущільнень в комунікаціях та запірній арматурі на обладнанні. У разі їх знаходження проводять підтягування різьбових з'єднань.

### ***ДР 1.3.4. Перевірка на герметичність***

Для перевірки обладнання на герметичність в апарат вносять невелику кількість леткої галогенвмісної речовини (дифторхлорметан). Далі закривають усю запірну арматуру ємнісного обладнання і подають аераційне повітря до

рівня надлишкового тиску  $P = 0,1-0,2$  МПа. Потім перекривають вентиль подачі повітря і фіксують показання манометра на кришці апарату та час витримки (30-60 хв) в операційному журналі. Після закінчення часу витримки звіряють покази манометра, якщо різниця менше 0,01 МПа, то апарат вважають герметичним. При більшому відхиленні за допомогою галогенного течієпошукача починають пошук неущільнень шляхом перевірки усіх місць з'єднань. При наблизенні щупа течієпошукача до місця нещільності фіксуються пари галогенвмісної речовини, що засвідчує наявність нещільності. При знаходженні усіх таких місць їх усувають шляхом підтягування різьбових з'єднань або замінюють прокладки. Потім апарат знову перевіряють на герметичність.

#### *ДР 1.3.5. Стерилізація обладнання*

Для проведення стерилізації в сорочку апарата подають глуху пару і нагрівають його до 80–90 °С. Відкривають усю запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях та підведених до апарата комунікаціях і подають гостру пару безпосередньо в апарат через нижній спуск, при цьому обов'язково відкривають вентиль виходу відпрацьованого повітря для видалення повітря з апарату. При досягненні температури стерилізації (130–135 °С) всю запірну арматуру, крім парової, закривають і витримують протягом 1 години. Після завершення витримки парову арматуру закривають, подають в апарат стерильне повітря, а в сорочку холодну воду. Процес охолодження здійснюють до досягнення температури 30–40 °С і надлишкового тиску  $P = 0,003-0,005$  МПа.

#### *ДР 1.4. Підготовка та стерилізація допоміжних розчинів.*

##### *ДР 1.4.1 Підготовка та стерилізація розчину соляної кислоти.*

У реактор місткістю 20 л вносять 2,4 л 30 % розчину соляної кислоти та порційно при перемішуванні вносять 9,6 л води питної. Стерилізують при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

##### *ДР 1.4.2 Підготовка та стерилізація розчину гідроксиду натрія.*

У реактор місткістю 20 л вносять 0.72 кг гідроксиду натрія та порційно при перемішуванні вносять 11,28 л води питної. Стерилізують при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

## ***ДР 2. Підготовка аераційного повітря***

### *ДР 2.1. Забір повітря*

Забір атмосферного повітря здійснюють на висоті 2-3 м від найвищого приміщення за допомогою пристрою для забору повітря.

### *ДР 2.2. Попереднє грубе очищення*

Повітря очищується від грубого аерозолю на фільтрі грубої очистки. Ступінь очищення – 90 %.

### *ДР 2.3. Стиснення повітря*

Повітря стискають у компресорі до 0,35 МПа, стиснення повітря в компресорі призводить до підвищення його температури до 120–250 °С і збільшення вмісту вологи.

### *ДР 2.4. Охолодження повітря*

Стиснене повітря «переохолоджують» в теплообміннику-охолоджувачі повітря до температури 25 °С для відведення надлишкової вологи.

### *ДР 2.5. Видалення зайвої вологи*

Повітря подають на ресивер для згладжування пульсацій і відділення зайвої вологи ( $W = 60\%$ ).

### *ДР 2.6. Нагрівання повітря*

Охоложене повітря підігривають в теплообміннику- нагрівачі до 35 °С для унеможливлення конденсації пари на волокнах головного та індивідуальних фільтрів.

### *ДР 2.7. Очищення на головному фільтрі*

У головному фільтрі тонкої очистки здійснюють попереднє очищення повітря від мікроорганізмів. Ступінь очищення – 96 %. Заміна фільтрувального матеріалу проводиться 2 рази на рік. У разі забруднення, зволоження, чи інфікування фільтруючого матеріалу проводять позачергову його заміну.

### *ДР 2.8. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі*

Всі інокулятори і ферментер оснащені індивідуальними фільтрами для заключної очистки повітря. Ступінь очищення досягає 99,999 %.

### ДР 3. Приготування та стерилізація поживних середовищ

*ДР 3.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках( для штаму +).*

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках наведений у *табл. 7.1.*

*Таблиця 7.1*

Об'єм середовища, яке необхідно приготувати	Концентрація, кг/ м <sup>3</sup>	Вміст компонента в 600 мл середовища, г,мл	Композиція	Об'єм композиції, мл
1	2	3	4	5
Крохмаль кукурудзяний	50	30	А	276
Соєве борошно	25	15		
Вода		230		
Бавовняняна олія	40	24	Б	24
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5	0,9	В	100
Вода		100		
MgSO <sub>4</sub>	0,5	0.3	Г	100
Вода		100		
Тіамін	0,002	0,012	Д	100
Вода		100		
Сума ∑	117	600	-	600

#### *ДР 3.1.1. Приготування і стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 30 г крохмалю кукурудзяного та 15 г борошна соєвого, вносять у колбу на 600 мл та додають 230 мл води питної. Перемішують та заварюють при перемішуванні за температури 90 °С після чого

закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві з режимом стерилізації 112°C 30 хв.

*ДР 3.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б*

На технічних вагах відміряють 24 г бавовняного масла у колбу місткістю 100 мл. Композиція стерилізації не підлягає.

*ДР 3.1.3. Приготування і стерилізація композиції В*

На вагах зважують 0.9 г  $K_2HPO_4$  і поміщають в колбу на 200 мл. Додають 100 мл води і перемішують до розчинення солей після чого закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві з режимом стерилізації 131°C 40 хв.

*ДР 3.1.4. Приготування і стерилізація композиції Г*

На вагах зважують 0.3 г  $MgSO_4$  і поміщають в колбу на 200 мл . Додають 100 мл води і перемішують до розчинення солей після чого закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві з режимом стерилізації 131°C 40 хв.

*ДР 3.1.5. Приготування і стерилізація композиції Д*

На вагах зважують 0.0012 г тіаміну гідрохлориду і поміщають в колбу на 200 мл. Додають 100 мл води і перемішують до розчинення солей після чого закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві з режимом стерилізації 112°C 30 хв.

***ДР 3.2 Приготування та стерилізація поживних середовищ для інокулятора на 6 л ( для штаму +)***

*Таблиця 7.2*

Об'єм середовища, яке необхідно приготувати	Концентрація, кг/ м <sup>3</sup>	Вміст компонента в 3000 мл середовища, г,мл	Композиція	Об'єм композиції, мл
1	2	3	4	5
Крохмаль кукурудзяний	50	150	А	1380

Соєве борошно	25	75		
Вода		1155		
Бавовняна олія	40	120	Б	120
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5	4,5	В	500
Вода		500		
MgSO <sub>4</sub>	0,5	1,5	Г	500
Вода		500		
Тіамін	0,002	0,006	Д	500
Вода		500		
Сума $\Sigma$	117	3000	-	3000

*ДР 3.2.1. Приготування і стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 150 г крохмалю кукурудзяного та 75 г борошна соєвого, вносять у колбу на 3000 мл та додають 1155 мл води питної. Перемішують та заварюють при перемішуванні за температури 90 °С після чого закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві з режимом стерилізації 112°C 30 хв.

*ДР 3.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б*

На технічних вагах відміряють 120 г бавовняного масла у колбу місткістю 25 мл. Композиція стерилізації не підлягає.

*ДР 3.2.3. Приготування і стерилізація композиції В*

На вагах зважують 4,5 г K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> і поміщають в колбу на 1000 мл. Додають 500 мл води і перемішують до розчинення солей після чого закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві з режимом стерилізації 131°C 40 хв.

*ДР 3.2.4. Приготування і стерилізація композиції Г*

На вагах зважують 1,5 г MgSO<sub>4</sub> і поміщають в колбу на 1000 мл. Додають 500 мл води і перемішують до розчинення солей після чого закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві з режимом стерилізації 131°C 40 хв.

*ДР 3.2.5. Приготування і стерилізація композиції Д*

На вагах зважують 0.006 г тіаміну гідрохлориду і поміщають в колбу на 1000 мл. Додають 500 мл води і перемішують до розчинення солей після чого закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві з режимом стерилізації 112°C 30 хв.

**ДР 3.3 Приготування та стерилізація поживних середовищ для посівного апарату на 63 л (для штаму +)**

Таблиця 7.3

Об'єм середовища, яке необхідно приготувати	Концентрація, кг/ м <sup>3</sup>	Вміст компонента в 33 л середовища, г,л	Композиція	Об'єм композиції, л
1	2	3	4	5
Крохмаль кукурудзяний	50	1650	А	28,7
Соеве борошно	25	825		
Вода		26 л		
Бавовняна олія	40	1,32	Б	1,32
К <sub>2</sub> НРО <sub>4</sub>	1,5	49,5	В	1
Вода		1 л		
MgSO <sub>4</sub>	0,5	16,5	Г	1
Вода		1		
Тіамін	0,002	0,066	Д	1
Вода		1		
Сума $\Sigma$	117	33	-	33

**ДР 3.3.1. Приготування і стерилізація композиції А**

На технічних вагах зважують 1650 г крохмалю кукурудзяного та 825 г борошна соєвого, вносять у реактор на 50 л та додають 26 л води питної, відміряної за допомогою об'ємно-вагового дозатора. Перемішують та заварюють при перемішуванні за температури 90 °С після чого стерилізують в цьому ж реакторі з режимом стерилізації 112°C 30 хв.

**ДР 3.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б**

На технічних вагах відміряють 1,32 кг бавовняного масла у колбу місткістю 25 мл. Композиція стерилізації не підлягає.

*ДР 3.3.3. Приготування і стерилізація композиції В*

На вагах зважують 49.5 г  $K_2HPO_4$  і поміщають в колбу на 2 л. Додають 1 л води і перемішують до розчинення солей після чого закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві з режимом стерилізації 131°C 40 хв.

*ДР 3.3.4. Приготування і стерилізація композиції Г*

На вагах зважують 16,5 г  $MgSO_4$  і поміщають в колбу на 2 л. Додають 1 л води і перемішують до розчинення солей після чого закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві з режимом стерилізації 131°C 40 хв.

*ДР 3.3.5. Приготування і стерилізація композиції Д*

На вагах зважують 0.066 г тіаміну гідрохлориду і поміщають в колбу на 2 л. Додають 1 л води і перемішують до розчинення солей після чого закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві з режимом стерилізації 112°C 30 хв.

***ДР 3.4 Приготування та стерилізація поживних середовищ для посівного апарату на 630 л. ( для штаму +)***

*Таблиця 7.4*

Об'єм середовища, яке необхідно приготувати	Концентрація, кг/ м <sup>3</sup>	Вміст компонента в 322 л середовища, кг ,л	Композиція	Об'єм композиції, л
1	2	3	4	5
Крохмаль кукурудзяний	50	16,1	А	298,2
Соеве борошно	25	8,05		
Вода		292 л		
Бавовняна	40	12,8	Б	12,8

олія				
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5	0.483	В	10
Вода		0.51 л		
MgSO <sub>4</sub>	0,5	0,161	Г	10
Вода		0.84		
Тіамін	0,002	0,66	Д	1
Вода		1		
Сума $\Sigma$	117	332	-	332

*ДР 3.4.1. Приготування і стерилізація композиції А*

За допомогою об'ємно-вагового дозатора зважують 16,1 кг крохмалю кукурудзяного та 8,05 кг борошна соєвого, вносять у реактор на 630 л та додають 274 л води питної. Перемішують та заварюють при перемішуванні за температури 90 °С після чого стерилізують в цьому ж реакторі з режимом стерилізації 112°C 30 хв.

*ДР 3.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б*

На технічних вагах відміряють 12,8 кг бавовняного масла у збірник місткістю 25 л. Композиція стерилізації не підлягає.

*ДР 3.4.3. Приготування і стерилізація композиції В*

На вагах зважують 483 г K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> і поміщають у збірник на 15 л. Додають 10 л води і перемішують до розчинення солей після чого закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві з режимом стерилізації 131°C 40 хв.

*ДР 3.4.4. Приготування і стерилізація композиції Г*

На вагах зважують 161 г MgSO<sub>4</sub> і поміщають в колбу на 15 л. Додають 10 л води і перемішують до розчинення солей після чого закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві з режимом стерилізації 131°C 40 хв.

*ДР 3.4.5. Приготування і стерилізація композиції Д*

На вагах зважують 0.66 г тіаміну гідрохлориду і поміщають в колбу на 2 л. Додають 1 л води і перемішують до розчинення солей після чого закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві з режимом стерилізації 112°C 30 хв.

**ДР 3.5. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках( для штаму -).**

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках наведений у табл. 7.4.

*Таблиця 7.5*

Об'єм середовища, яке необхідно приготувати	Концентрація, кг/ м <sup>3</sup>	Вміст компонента в 600 мл середовища, г,мл	Композиція	Об'єм композиції, мл
1	2	3	4	5
Крохмаль кукурудзяний	50	30	А	260
Соєве борошно	25	15		
Вода		230		
Бавовняна олія	40	24	Б	24
К <sub>2</sub> НРО <sub>4</sub>	1,5	0,9	В	100
Вода		100		
MgSO <sub>4</sub>	0,5	0.3	Г	100
Вода		100		
Тіамін	0,002	0,0012	Д	100
Вода		100		
Сума $\Sigma$	117	600	-	600

*ДР 3.5.1. Приготування і стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 30 г крохмалю кукурудзяного та 15 г борошна соєвого, вносять у колбу на 600 мл та додають 230 мл води питної. Перемішують та заварюють при перемішуванні за температури 90 °С після чого закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві з режимом стерилізації 112°С 30 хв.

*ДР 3.5.2. Приготування і стерилізація композиції Б*

На технічних вагах відміряють 24 г бавовняного масла у колбу місткістю 100 мл. Композиція стерилізації не підлягає.

*ДР 3.5.3. Приготування і стерилізація композиції В*

На вагах зважують 0.9 г  $K_2HPO_4$  і поміщають в колбу на 200 мл. Додають 100 мл води і перемішують до розчинення солей після чого закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві з режимом стерилізації 131°C 40 хв.

*ДР 3.5.4. Приготування і стерилізація композиції Г*

На вагах зважують 0.3 г  $MgSO_4$  і поміщають в колбу на 200 мл. Додають 100 мл води і перемішують до розчинення солей після чого закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві з режимом стерилізації 131°C 40 хв.

*ДР 3.5.5. Приготування і стерилізація композиції Д*

На вагах зважують 0.0012 г тіаміну гідрохлориду і поміщають в колбу на 200 мл. Додають 100 мл води і перемішують до розчинення солей після чого закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві з режимом стерилізації 112°C 30 хв.

***ДР 3.6 Приготування та стерилізація поживних середовищ для інокулятора на 6 л ( для штаму -)***

*Таблиця 7.6*

Об'єм середовища, яке необхідно приготувати	Концентрація, кг/ м <sup>3</sup>	Вміст компонента в 3000 мл середовища, г,мл	Композиція	Об'єм композиції, мл
1	2	3	4	5
Крохмаль кукурудзяний	50	150	А	1380
Соеве борошно	25	75		
Вода		1155		
Бавовняна	40	120	Б	120

олія				
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5	4,5	В	500
Вода		500		
MgSO <sub>4</sub>	0,5	1,5	Г	500
Вода		500		
Тіамін	0,002	0,006	Д	500
Вода		500		
Сума $\Sigma$	117	3000	-	3000

*ДР 3.6.1. Приготування і стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 150 г крохмалю кукурудзяного та 75 г борошна соєвого, вносять у колбу на 3000 мл та додають 1155 мл води питної. Перемішують та заварюють при перемішуванні за температури 90 °С після чого закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві з режимом стерилізації 112°С 30 хв.

*ДР 3.6.2. Приготування і стерилізація композиції Б*

На технічних вагах відміряють 120 г бавовняного масла у колбу місткістю 25 мл. Композиція стерилізації не підлягає.

*ДР 3.6.3. Приготування і стерилізація композиції В*

На вагах зважують 4,5 г K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> і поміщають в колбу на 1000 мл. Додають 500 мл води і перемішують до розчинення солей після чого закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві з режимом стерилізації 131°С 40 хв.

*ДР 3.6.4. Приготування і стерилізація композиції Г*

На вагах зважують 1,5 г MgSO<sub>4</sub> і поміщають в колбу на 1000 мл. Додають 500 мл води і перемішують до розчинення солей після чого закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві з режимом стерилізації 131°С 40 хв.

*ДР 3.6.5. Приготування і стерилізація композиції Д*

На вагах зважують 0.006 г тіаміну гідрохлориду і поміщають в колбу на 1000 мл. Додають 500 мл води і перемішують до розчинення солей після чого закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві з режимом стерилізації 112°С 30 хв.

*ДР 3.7 Приготування та стерилізація поживних середовищ для посівного апарату на 60 л (для штаму -)*

*Таблиця 7.7*

Об'єм середовища, яке необхідно приготувати	Концентрація, кг/ м <sup>3</sup>	Вміст компонента в 33 л середовища, г,л	Композиція	Об'єм композиції, л
1	2	3	4	5
Крохмаль кукурудзяний	50	1650	А	28,7
Соеве борошно	25	825		
Вода		26 л		
Бавовняна олія	40	1,32	Б	1,32
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5	0.0456	В	1
Вода		1 л		
MgSO <sub>4</sub>	0,5	0.0165	Г	1
Вода		1		
Тіамін	0,002	0,066	Д	1
Вода		1		
Сума Σ	117	33	-	33

*ДР 3.7.1. Приготування і стерилізація композиції А*

За допомогою об'ємно-вагового дозатора зважують 1650 г крохмалю кукурудзяного та 825 г борошна соєвого, вносять у реактор на 50 л та додають 26 л води питної. Перемішують та заварюють при перемішуванні за температури 90 °С після стерилізують в цьому ж реакторі з режимом стерилізації 112°С 30 хв.

*ДР 3.7.2. Приготування і стерилізація композиції Б*

На технічних вагах відміряють 1,32 кг бавовняного масла у колбу місткістю 25 мл. Композиція стерилізації не підлягає.

*ДР 3.7.3. Приготування і стерилізація композиції В*

На вагах зважують 49.5 г K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> і поміщають в колбу на 2 л . Додають 1 л води і перемішують до розчинення солей після чого закривають ватно-

марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві з режимом стерилізації 131°C 40 хв.

*ДР 3.7.4. Приготування і стерилізація композиції Г*

На вагах зважують 16,5 г MgSO<sub>4</sub> і поміщають в колбу на 2 л . Додають 1 мл води і перемішують до розчинення солей після чого закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві з режимом стерилізації 131°C 40 хв.

*ДР 3.7.5. Приготування і стерилізація композиції Д*

На вагах зважують 0.066 г тіаміну гідрохлориду і поміщають в колбу на 2 л . Додають 1 л води і перемішують до розчинення солей після чого закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві з режимом стерилізації 112°C 30 хв.

***ДР 3.8 Приготування та стерилізація поживних середовищ для виробничого ферментера на 6,3 м<sup>3</sup>.***

***Стерилізація середовища буде проходити в УБС-5 та готуватися буде в одному реакторі.***

*Таблиця 7.8*

Об'єм середовища, яке необхідно приготувати	Концентрація, кг/ м <sup>3</sup>	Вміст компонента в 3560 л середовища, кг ,л	Композиція	Об'єм композиції, л
1	2	3	4	5
Крохмаль кукурудзяний	50	178	А	3560
Соеве борошно	25	89		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5	5,478		
MgSO <sub>4</sub>	0,5	1.78		
Тіамін	0,002	0,007		
Вода		3143,75		
Бавовняна олія	40	142	Б	142

Сума $\Sigma$	117	3560	-	3560
---------------	-----	------	---	------

#### *ДР 3.8.1. Приготування і стерилізація композиції А*

Через об'ємно-ваговий дозатор 178 кг крохмалю кукурудзяного та 89 кг борошна соєвого, 1,78 кг  $MgSO_4$ , 5,478 кг  $K_2HPO_4$ , 0,007 кг тіаміну гідрохлориду вносять у реактор на 4000 л та додають 3143.7 л води питної. Стерилізують в теплообміннику УБС за температури 140 °С упродовж 1-2 хв.

#### *ДР 3.8.2. Приготування і стерилізація композиції Б*

Через об'ємно-ваговий дозатор відміряють 142 кг бавовняного масла та вносять у подальшому до поживного середовища. Композиція стерилізації не підлягає.

### ***ТП 4. Підготовка посівного матеріалу***

#### ***ТП 4.1 Підготовка посівного матеріалу *B. trispora* NRRL 2895 (+)***

##### *ТП 4.1.1 Підтримання колекційної культури *B. trispora* NRRL 2895 (+)*

Колекційну культуру зберігають у пробірках на скошеному сусло-агарі. Пересіви здійснюють кожні 3-4 місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводять в строго асептичних умовах.

##### *ТП 4.1.2. Вирощування робочої культури на агаризованому середовищі*

Отримані ізолювані колонії в асептичних умовах пересівають петлею у пробірки з агаризованим сусло-агаровим середовищем. В пробірки засівають ізолювані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см одна від одної. Тривалість інкубування 48 год при температурі 25 °С.

##### *ТП 4.1.3. Одержання культури на агаризованому середовищі*

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках з середовищем Сабуро., розсівають петлею до ізолюваних колоній на чашках Петрі з середовищем в асептичних умовах. Вирощують при температурі 25 °С упродовж 48 год при.

##### *ТП 4.1.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках*

Для вирощування посівного матеріалу у колбу з композицією А (від ДР 3.1.1.), вносять композицію Б (від ДР 3.1.2), композицію В(від ДР 3.1.3), композицію Г(від ДР 3.1.4), композицію Д(від ДР 3.1.5), та перемішують і

розливають в стерильні качалочні колби на 750 мл і в кожну колбу в асептичних умовах.

У пробірку з робочою культурою, вирощеною на СА, асептично вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану суспензію клітин і вносять у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують суспензію клітин, одержану з однієї пробірки.

Після вирощування штаму у колбах на качалці при 25°C упродовж 48 год та 200 об / хв культуральну рідину з колб в асептичних умовах переносять у стерильну засівну колбу.

*ТП 4.1.5. Вирощування посівного матеріалу в качалочних колбах( 2 штуки)*

У ємність на 3 л стерилізовану окремо вносять композицією А (від ДР 3.1.1.), вносять композицію Б (від ДР 3.1.2), композицію В (від ДР 3.1.3), композицію Г (від ДР 3.1.4), композицію Д (від ДР 3.1.5), перемішують. Після цього додають посівний матеріал (від ТП 4.2.4) та розливають у 2 качалочні колби по 300 мл на кожну.

Культивують при температурі 25 °С упродовж 48 год, при 200 об/хв.

*ТП 4.1.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі*

В інокулятор на 6 л стерилізований окремо вносять композицією А (від ДР 3.2.1.), вносять композицію Б (від ДР 3.2.2), композицію В (від ДР 3.2.3), композицію Г (від ДР 3.2.4), композицію Д (від ДР 3.2.5), перемішують. Після цього додають посівний матеріал (від ТП 4.1.5). Починають процес культивування. Культивують при температурі 25 °С упродовж 48 год, подача кисню аерацією 1,9 л/хв.

*ТП 4.1.7. Вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 63 л*

В посівний апарат об'ємом 63 л з вносять композицією А (від ДР 3.3.1.), вносять композицію Б (від ДР 3.3.2), композицію В (від ДР 3.3.3), композицію Г (від ДР 3.3.4), композицію Д(від ДР 3.3.5),. Після цього через

засівну колбу подають посівний матеріал (від *ТП 4.1.6*). Встановлюють рН на рівні 6,5 за допомогою додавання титрантів (ДР 1.4.1, 1.4.2.). Включають перемішувачий пристрій, аерацію, подають стерильне стиснене повітря.

Культивують при температурі 25 °С упродовж 48 год, витрати повітря 1,7 л/(л·хв).

*ТП 4.1.8. Вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 630 л*

В посівний апарат об'ємом 630 л зносять композицію композицією А (від *ДР 3.4.1.*), вносять композицію Б (від *ДР 3.4.2.*), композицію В(від *ДР 3.4.3.*), композицію Г (від *ДР 3.4.4.*), композицію Д (від *ДР 3.4.5.*). Після цього через трубу перетискування подають посівний матеріал (від *ТП 4.1.7*). Встановлюють рН на рівні 6,5 за допомогою додавання титрантів ( ДР 1.4.1, 1.4.2.). Включають перемішувачий пристрій, аерацію, подають стерильне стиснене повітря.

Культивують при температурі 25 °С упродовж 48 год, витрати повітря 1,7 л/(л·хв).

#### ***ТП 4.2 Підготовка посівного матеріалу *V. trispora* 15 (-)***

##### *ТП 4.2.1 Підтримання колекційної культури *V. trispora* 15 (-)*

Колекційну культуру зберігають у пробірках на скошеному сусло-агарі. Пересіви здійснюють кожні 3-4 місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводять в строго асептичних умовах.

##### *ТП 4.2.2. Вирощування робочої культури на агаризованому середовищі*

Отримані ізольовані колонії в асептичних умовах пересівають петлею у пробірки з агаризованим сусло-агаровим середовищем. В пробірки засівають ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см одна від одної. Тривалість інкубування 48 год при температурі 25 °С.

##### *ТП 4.2.3. Одержання культури на агаризованому середовищі*

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках з середовищем Сабуро., розсівають петлею до ізольованих колоній на чашках Петрі з середовищем в асептичних умовах. Вирощують при температурі 25 °С упродовж 48 год при.

#### *ТП 4.2.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках*

Для вирощування посівного матеріалу у колбу з композицією А (від ДР 3.5.1.), вносять композицію Б (від ДР 3.5.2), композицію В (від ДР 3.5.3), композицію Г (від ДР 3.5.4), композицію Д (від ДР 3.5.5), та перемішують і розливають в стерильні качалочні колби на 750 мл і в кожну колбу в асептичних умовах.

У пробірку з робочою культурою, вирощеною на СА, асептично вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану суспензію клітин і вносять у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують суспензію клітин, одержану з однієї пробірки.

Після вирощування штаму у колбах на качалці при 25°C упродовж 48 год та 200 об / хв культуральну рідину з колб в асептичних умовах переносять у стерильну засівну колбу.

#### *ТП 4.2.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі*

В інокулятор на 6 л стерилізований окремо вносять композицією А (від ДР 3.6.1.), вносять композицію Б (від ДР 3.6.2), композицію В (від ДР 3.6.3), композицію Г (від ДР 3.6.4), композицію Д (від ДР 3.6.5), перемішують. Після цього додають посівний матеріал (від ТП 4.6.4). Починають процес культивування. Культивують при температурі 25 °С упродовж 48 год, подача кисню аерацією 1,9 л/хв.

#### *ТП 4.2.6. Вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 63 л*

В посівний апарат об'ємом 63 л з вносять композицією А (від ДР 3.7.1.), вносять композицію Б (від ДР 3.7.2), композицію В (від ДР 3.7.3), композицію Г (від ДР 3.7.4), композицію Д (від ДР 3.7.5). Після цього через трубу перетискування подають посівний матеріал (від ТП 4.2.5). Встановлюють рН на рівні 6,5 за допомогою додавання титрантів (ДР 1.4.1, 1.4.2.). Включають перемішувач, аерацію, подають стерильне стиснене повітря через.

Культивують при температурі 25 °С упродовж 48 год, витрати повітря 1,9 л/(л·хв).

### **ТП 5. Біосинтез**

#### *ТП 5.1. Біосинтез у ферментері об'ємом 6,3м<sup>3</sup>.*

У простерилізований ферментер через трубопроводи в стерильних умовах перекачують простерилізовану композицію А (від ДР 3.8.1) та бавовняну олію (від ДР 3.8.2), туди ж перекачують увесь посівний матеріал обох штамів (від ТП 4.2.6 та ТП 4.1.8). Перемішують до настання гомогенності, встановлюють рН на рівні 6,5 за допомогою додавання титрантів (ДР 1.4.1, 1.4.2.) та починають процес культивування. Перемішування відбувається зі швидкістю 200 об / хв при 25 ° С протягом 120 год при рН=6,5. Витрати повітря становлять 1, 9 л/л·хв. Кожні 3-4 години відбирають проби культуральної рідини на аналіз концентрацій джерела азоту та вуглецю, біомаси та цільового продукту.

### **ТП 6. Зберігання культуральної рідини.**

Культуральну рідину об'ємом 3,6 м<sup>3</sup> (від ТП 5.1) по трубопроводам за допомогою відцентрового насоса подають у збірник (З-1) об'ємом 6,3 м<sup>3</sup>.

### **ТП 7. Відділення біомаси.**

#### *ТП 7.1. Фільтрування на стрічковому фільтр-пресі.*

Культуральна рідина (від ТП 6) по трубопроводам за допомогою відцентрового насоса (Н-2) направляється зі збірника на стрічковий фільтр прес (ФП-3) продуктивністю 3 м<sup>3</sup>/год на 1,2 год. По завершенню фільтрації автоматичні ножі зрізають відфільтровану біомасу ( масою 246,24 кг) зі стрічки фільтр-пресу у збірник біомаси на коліщатках (З-4), який потім направляється на підсушування (до ТП 8.1). Фільтрат масою 3353,76 л йде на утилізацію відходів.

### **ТП 8. Сушіння біомаси.**

#### *ТП 8.1. Сушіння у вакуум-сушильній шафі.*

246,24 кг вологої біомаси (від ТП 7.1) зі збірника на коліщатках (З-4) вручну розкладається по полицях вакуумної сушильної шафи місткістю 100 кг (ВСШ-5). Біомаса висушується до 20 % вологості (81,3 кг). Сушіння триває 3

год при температурі 60°C. 100 кПа. Після закінчення процесу сушіння вирівнюємо тиск у вакуумній шафі, відкриваємо шафу та виймаємо деко, з висушеною біомасою, яка пристала до дека. Шкребокком видаляємо біомасу з дека та перекладаємо у збірник на коліщатках (З-6), який направляємо на екстракцію (до ТП 9.1).

## **ТП 9. Виділення цільового продукту.**

### *ТП 9.1 Екстракція лікопіну.*

Біомаса вологістю 20 % (від ТП 8.1) зі збірника на коліщатках (З-6) вручну переноситься в екстрактор, місткістю 400 л (Е-7) через його верхній люк. Туди ж зі збірника (З-8) доливається 203,25 л етилацетату. Екстракція проводиться при температурі 65 °С, яка забезпечується сорочкою нагрівання, в яку подається пара. Швидкість обертів мішалки 200 об/хв. Екстракція триває на протязі 15 хв.

### *ТП 9.2. Розділення фаз органічного екстракту.*

Після завершення екстракції, зупиняємо мішалку та даємо екстракту годину на відстоювання. В екстракторі є пориста перегородка, яка не пропускає на дно детрит. Отже, після відстоювання, детрит залишається на пористій перегородці, який через дверцята на рівні перегородки видаляється вручну. Тим часом органічний екстракт зливається у переносну ємність через трубопровід знизу апарата. Відділений детрит (28,55 кг) відправляється на утилізацію, а органічний екстракт, об'ємом 256 л, зливається у переносну ємність (З-9) об'ємом 300 л та направляється на концентрацію цільового продукту (до ТП 10.1).

## **ТП 10. Концентрація цільового продукту.**

### *ТП 10.1. Випарювання під вакуумом.*

Зі збірника (З-9) (від ТП 9.2) у верхній контактний пристрій вакуум-випарної установки (ВВУ- 10) подається 256 л органічного екстракту. Екстракт випарюють за температури 70° С до 50 % випарення рідини на протязі 1 год.

Пари етилацетату подаються в конденсатор (КД-11), де конденсуються. Сконцентрований екстракт (127 л) переносимо у збірник (З-12) об'ємом 150 л та направляємо на кристалізацію (до ТП 11.1).

### **ТП 11. Кристалізація цільового продукту.**

#### *ТП 11.1. Кристалізація лікопіну.*

127 л органічного екстракту (від ТП 10.1) зі збірника (З-12) подається через верхній люк у кристалізатор (К-13), обладнаний якірною мішалкою і сорочкою охолодження об'ємом 200 л, додаємо в екстракт затравку, яка залишилася після попереднього циклу виготовлення лікопіну, та охолоджуємо до температури 4°C. Кристалізація триває 12 год. Швидкість обертів мішалки 10 об/хв. Після, зкристалізований органічний екстракт (120 л) відправляють на фільтрування (до ТП 12.1).

### **ТП 12. Фільтрація кристалів цільового продукту**

#### *ТП 12.1. Фільтрація кристалів лікопіну.*

Зкристалізований органічний екстракт (від ТП 11.1) по трубопроводам за допомогою шестеренного насосу (Н-14) направляється в НУТЧ-фільтр (НФ-15) з сорочкою, продуктивністю 100 л/год. Фільтрування триває 1,2 години.

Після кристали лишають у цьому ж фільтрі для промивання (до ТП 13.1), а фільтрат відправляють на утилізацію.

### **ТП 13. Промивання кристалів.**

#### *ТП 13.1. Промивання кристалів лікопіну.*

До кристалів лікопіну (від ТП 12.1) в НУТЧ-фільтр (НФ-15) зі збірника (З-16) заливають 35 л етанолу. Промивання відбувається при температурі 3°C. Після етанол йде на регенерацію, кристали лікопіну ( 3,5 кг) перекладаються у переносну ємність об'ємом 4 л (З-17) та відправляються на сушіння (до ТП 14.1).

### **ТП 14. Сушіння цільового продукту**

#### *ТП 14.1. Сушіння кристалів лікопіну у вакуумній сушарці.*

Промиті кристали лікопіну (від ТП 12.1) з ємності (З-17) вручну переносять у вакуумну сушильну шафу (ВСШ-18) продуктивність 5 кг/цикл.

Кристали висушують до 5% вологості (3,5 кг). Сушіння триває 5 год при температурі 80°C. 100 кПа. Потім висушені кристали збирають у ємність об'ємом 4 л (З-19) та переносять на пакування (до ПМВ 15.1).

**ПМВ 15. Пакування, маркування, відвантаження.**

*ПМВ 15.1. Фасування, пакування, маркування кристалів лікопіну.*

Кристали лікопіну (від ТП 14.1) переносять на робочу поверхню (РП-20) та вручну фасують та упаковують у вологонепроникні металізовані тришарові поліетиленові упаковки по 50 г.

## РОЗДІЛ 8. МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ КОНТРОЛЬ

Таблиця 8.1.

### 8.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Метод контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кх 1.1.1. Підготовка 2 % розчину кальцинованої соди для миття поверхонь приміщення	Концентрація робочого розчину кальцинованої соди	Хімічний метод	Після приготування розчину	C=2 %
Кх 1.1.2. Підготовка 0,5 % розчину Засобу Гембар	Концентрація робочого розчину Гембару	Хімічний метод	Після приготування розчину	C=0,5%

					НУХТ БТЕК 04 02 36 КР ПЗ			
Змн	Лист	№ докум	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 8. МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ КОНТРОЛЬ	Літ	Док	Дружнів
Розроб		Горлаш Д. Ю.				100	140	100
Консультант								
Керівник		Пенчук Ю. М.						
Зав.кафедри		Пирог Т.П.						
						Кафедра БТМ		

Кх 1.1.3. Підготовка 0,5 % розчину Засобу Дезамін	Концентрація робочого розчину Дезаміну	Хімічний метод	Після приготування розчину	C=0,5 %
Кх, Км 1.2.1. Генеральне прибирання	Підлога, стіни, двері та вікна	Візуальний огляд, КУО $\leq 300$	Під час прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруд
Кх, Км 1.2.2. Щоденне прибирання	Підлога	Візуальний огляд, КУО $\leq 800$	Під час прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруд
Кт 1.3.1. Миття з'ємних частин обладнання	З'ємні частини обладнання, мийний розчин, температура мийного розчину, чистота	Термометр технічний	Під час проведення операції обробки, візуальний огляд після миття	t=75°C
Кт 1.3.2. Ополіскування обладнання	Обладнання та комунікацій після ополіскування	Термометр технічний	Після ополіскування	t=20°C
Кт 1.3.3.	Обладнання та	Візуальний контроль	Після ополіскування	Обладнання без

Технічний огляд	комунікацій			видимих дефектів
Кт 1.3.4. Перевірка на герметичність	Обладнання та комунікацій	Надлишковий тиск 0.1-0.2 МПа.	Після техогляду.	Обладнання без видимих дефектів
Кт 1.3.5. Стерилізація	Обладнання та комунікації після технічного огляду	Термометр технічний. Барометр технічний	Після перевірки на герметичність	t=135 °C
Кх 1.4.1 Підготовка і стерилізація розчину соляної кислоти	Концентрація гідроксиду , час, стерильність, концентрація	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	C= 6 % t=131°C T=40 хв Відсутність мікробіоти
Кх 1.4.2 Підготовка розчину гідроксиду натрія	Концентрація соляної кислоти , , час, стерильність,	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	C= 6 % t=131°C T=40 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.1 Приготування і	Композиція А , температура, час,	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний	Температура визначається безперервно під час	t=112°C

стерилізація композиції А	стерильність.	контроль	стерилізації, мікробіологічний контроль- після	Т=30 хв Відсутність мікробіоти
------------------------------	---------------	----------	--	-----------------------------------

Кт, Км 3.1.2 Приготування і стерилізація композиції <b>Б</b>	Композиція <b>Б</b> Стерилізації не підлягає	Візуальний контроль	Стерилізації не підлягає	Стерилізації не підлягає
Кт, Км 3.1.3 Приготування і стерилізація композиції <b>В</b>	Композиція <b>В</b> , температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	t=131 <sup>0</sup> С Т=40 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.4 Приготування і стерилізація композиції <b>Г</b>	Композиція <b>Г</b> , температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	t=131 <sup>0</sup> С Т=40 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.5 Приготування і стерилізація композиції <b>Д</b>	Композиція <b>Д</b> , температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	t=112 <sup>0</sup> С Т=30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.1 Приготування і	Композиція <b>А</b> , температура, час,	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний	Температура визначається безперервно під час	t=112 <sup>0</sup> С

стерилізація композиції <b>А</b>	стерильність.	контроль	стерилізації, мікробіологічний контроль- після	T=30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.2 Приготування і стерилізація композиції <b>Б</b>	Композиція <b>Б</b> Стерилізації не підлягає	Візуальний контроль	Стерилізації не підлягає	Стерилізації не підлягає
Кт, Км 3.2.3 Приготування і стерилізація композиції <b>В</b>	Композиція <b>В</b> , температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	t=131 <sup>0</sup> C T=40 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.4 Приготування і стерилізація композиції <b>Г</b>	Композиція <b>Г</b> , температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	t=131 <sup>0</sup> C T=40 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.5 Приготування і стерилізація композиції <b>Д</b>	Композиція <b>Д</b> , температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	t=112 <sup>0</sup> C T=30 хв

				Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.1 Приготування і стерилізація композиції <b>А</b>	Композиція <b>А</b> , температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	t=112 <sup>0</sup> С Т=30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.2 Приготування і стерилізація композиції <b>Б</b>	Композиція <b>Б</b> Стерилізації не підлягає	Візуальний контроль	Стерилізації не підлягає	Стерилізації не підлягає
Кт, Км 3.3.3 Приготування і стерилізація композиції <b>В</b>	Композиція <b>В</b> , температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	t=131 <sup>0</sup> С Т=40 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.4 Приготування і стерилізація композиції <b>Г</b>	Композиція <b>Г</b> , температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	t=131 <sup>0</sup> С Т=40 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.5 Приготування і	Композиція <b>Д</b> , температура, час,	Термометр технічний, годинник,	Температура визначається	

стерилізація композиції Д	стерильність.	мікробіологічний контроль	безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	t=112 <sup>0</sup> C T=30 хв  Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	t=112 <sup>0</sup> C T=30 хв  Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.4.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б Стерилізації не підлягає	Візуальний контроль	Стерилізації не підлягає	Стерилізації не підлягає
Кт, Км 3.4.3 Приготування і стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	t=131 <sup>0</sup> C T=40 хв  Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.4.4 Приготування і стерилізація	Композиція Г, температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації,	t=131 <sup>0</sup> C T=40 хв

композиції <b>Г</b>			мікробіологічний контроль- після	Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.4.5 Приготування і стерилізація композиції <b>Д</b>	Композиція <b>Д</b> , температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	t=112 <sup>0</sup> C T=30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.5.1 Приготування і стерилізація композиції <b>А</b>	Композиція <b>А</b> , температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	t=112 <sup>0</sup> C T=30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.5.2 Приготування і стерилізація композиції <b>Б</b>	Композиція <b>Б</b> Стерилізації не підлягає	Візуальний контроль	Стерилізації не підлягає	Стерилізації не підлягає
Кт, Км 3.5.3 Приготування і стерилізація композиції <b>В</b>	Композиція <b>В</b> , температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	t=131 <sup>0</sup> C T=40 хв Відсутність мікробіоти

Кт, Км 3.5.4 Приготування і стерилізація композиції Г	Композиція Г , температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	t=131 <sup>0</sup> С Т=40 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.5.5 Приготування і стерилізація композиції Д	Композиція Д , температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	t=112 <sup>0</sup> С Т=30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.6.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А , температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	t=112 <sup>0</sup> С Т=30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.6.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б Стерилізації не підлягає	Візуальний контроль	Стерилізації не підлягає	Стерилізації не підлягає
Кт, Км 3.6.3 Приготування і	Композиція В , температура, час,	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний	Температура визначається безперервно під час	t=131 <sup>0</sup> С Т=40 хв

стерилізація композиції <b>В</b>	стерильність.	контроль	стерилізації, мікробіологічний контроль- після	Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.6.4 Приготування і стерилізація композиції <b>Г</b>	Композиція <b>Г</b> , температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	t=131 <sup>0</sup> C T=40 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.6.5 Приготування і стерилізація композиції <b>Д</b>	Композиція <b>Д</b> , температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	t=112 <sup>0</sup> C T=30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.7.1 Приготування і стерилізація композиції <b>А</b>	Композиція <b>А</b> , температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	t=112 <sup>0</sup> C T=30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.7.2 Приготування і стерилізація	Композиція <b>Б</b> Стерилізації не підлягає	Візуальний контроль	Стерилізації не підлягає	Стерилізації не підлягає

композиції <b>Б</b>				
Кт, Км 3.7.3 Приготування і стерилізація композиції <b>В</b>	Композиція <b>В</b> , температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	t=131 <sup>0</sup> C T=40 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.7.4 Приготування і стерилізація композиції <b>Г</b>	Композиція <b>Г</b> , температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	t=131 <sup>0</sup> C T=40 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.7.5 Приготування і стерилізація композиції <b>Д</b>	Композиція <b>Д</b> , температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	t=112 <sup>0</sup> C T=30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.8.1 Приготування і стерилізація композиції <b>А</b>	Композиція <b>А</b> , температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	t=112 <sup>0</sup> C T=30 хв

				Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.8.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б Стерилізації не підлягає	Візуальний контроль	Стерилізації не підлягає	Стерилізації не підлягає
Кт, Км, Кх 4.1.4 Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, рН-метр мікробіологічний контроль	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі	t=25 <sup>0</sup> C T=48 год n=200 об/хв Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 4.1.5 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 6 л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, рН-метр мікробіологічний контроль	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі	t=25 <sup>0</sup> C T=48 год n=200 об/хв Відсутність сторонньої мікробіоти

<p>Кт, Км, Кх 4.1.6</p> <p>Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 63 л</p>	<p>Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість</p> <p>перемішування, чистота культури</p>	<p>Термометр технічний, годинник, тахометр, рН-метр мікробіологічний контроль</p>	<p>Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі</p>	<p><math>t=25^{\circ}\text{C}</math></p> <p><math>T=48</math> год</p> <p><math>n=200</math> об/хв</p> <p>Відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км, Кх 4.1.7</p> <p>Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 630 л</p>	<p>Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість</p> <p>перемішування, чистота культури</p>	<p>Термометр технічний, годинник, тахометр, рН-метр мікробіологічний контроль</p>	<p>Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі</p>	<p><math>t=25^{\circ}\text{C}</math></p> <p><math>T=48</math> год</p> <p><math>n=200</math> об/хв</p> <p>Відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км, Кх 4.2.4</p> <p>Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках</p>	<p>Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість</p> <p>перемішування, чистота культури</p>	<p>Термометр технічний, годинник, тахометр, рН-метр мікробіологічний контроль</p>	<p>Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі</p>	<p><math>t=25^{\circ}\text{C}</math></p> <p><math>T=48</math> год</p> <p><math>n=200</math> об/хв</p> <p>Відсутність сторонньої мікробіоти</p>

<p>Кт, Км, Кх 4.2.5</p> <p>Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 6 л</p>	<p>Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, чистота культури</p>	<p>Термометр технічний, годинник, тахометр, рН-метр мікробіологічний контроль</p>	<p>Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі</p>	<p><math>t=25^{\circ}\text{C}</math>  <math>T=48</math> год  <math>n=200</math> об/хв  Відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км, Кх 4.2.6</p> <p>Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 63 л</p>	<p>Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, чистота культури</p>	<p>Термометр технічний, годинник, тахометр, рН-метр мікробіологічний контроль</p>	<p>Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі</p>	<p><math>t=25^{\circ}\text{C}</math>  <math>T=48</math> год  <math>n=200</math> об/хв  Відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км, Кх 6.1</p> <p>Виробничий біосинтез у виробничому ферментері</p>	<p>Культуральна рідина, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, чистота культури, концентрація біомаси</p>	<p>Термометр технічний, годинник, тахометр, рН-метр мікробіологічний контроль, визначення бензилпеніциліну за допомогою градуювального графіка.</p>	<p>Під час вирощування культури в ферментері, відбір проб: кожні 5 годин</p>	<p><math>\text{pH}=6,5</math>  <math>t=25^{\circ}\text{C}</math>  <math>T=120</math> год  <math>n=200</math> об/хв  Відсутність сторонньої мікробіоти,</p>

	выражена			$V = 1.9 \text{ л/хв}$
--	----------	--	--	------------------------

## 8.2. Мікробіологічний контроль

### - поживного середовища.

Для мікробіологічного контролю стерильності поживного середовища використовують чашки Петрі з СА – для виявлення грибів і дріжджів та МПА – для виявлення бактерій.

*Підготовка чашок Петрі.* Спочатку стерилізуємо чашки Петрі у сухожаровій шафі. Потім в них заливають по 20-30 мл поживного середовища, яке попередньо розплавляли на водяній бані. Чашки залишають на рівній поверхні для повного та рівномірного застигання. Потім витримують 2-3 доби в термостаті при 30°C кришками донизу, щоб запобігти потраплянню конденсату на середовище.

*Посів проби поживного середовища.* З середовища стерильною піпеткою відбирається проба об'ємом 0,1 мл та наноситься на поверхню СА та рівномірно розподіляється штателем Дригальського. За таким же методом засіваємо середовище на МПА. Всі ці маніпуляції акуратно виконуються у стерильній зоні біля запаленої спиртівки. Чашки загортають в папір кришками донизу, підписують та ставлять у термостат при температурі 32-34 °C протягом 1-2 діб для МПА та при температурі 24-26 °C протягом 3-5 діб для СА.

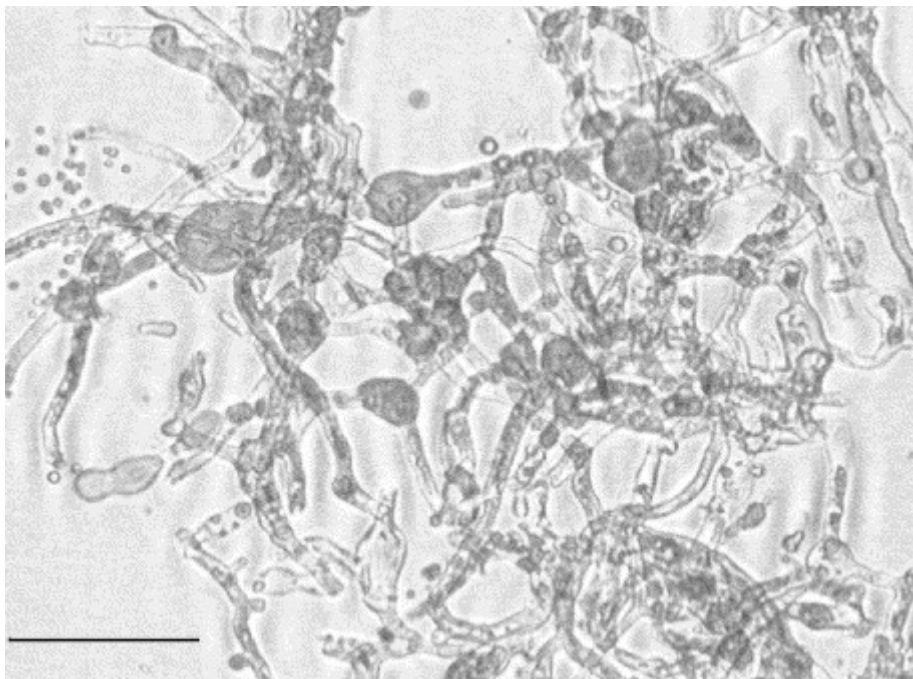
Після закінчення інкубації відсутність мікроорганізмів визначають візуально [77].

### - чистоти культур *Blakeslea trispora* NRRL 2895 (+) та *B. trispora* I5 (-).

Культури висівають у чашки Петрі з СА та МПА для визначення грибів, дріжджів та бактерій, відповідно. Також застосовують мікроскопіювання.

Для мікроскопіювання застосовують світловий мікроскоп. На сухе знежирене предметне скельце в асептичних умовах петлею біля запаленої спиртівки наносять краплю культуральної рідини, акуратно під кутом 45° краплю накривають маленьким скельцем, притискають на фільтрувальним папером припирають зайву вологу. Готовий препарат мікроскопіюють при збільшенні x40.

Якщо стороння мікробіота відсутня, ми бачимо, характерні для *Blakeslea trispora* продовгувато овальні спори, що розташовані на довгих гіфках повітряного міцелію. Зигоспори зазвичай мають діаметр 40-80 мкм, кулясті та злегка сплюснуті (Рис. 8.1).



**Рис. 8.1. *Blakeslea trispora***

### **8.3. Показники росту і синтезу лікопіну**

#### **8.3.1. Концентрація біомаси.**

В процесі ферментації відбираємо 200 мл культуральної рідини, відфільтровуємо за допомогою фільтрувального паперу. Фільтрат виливається у колбу, а біомаса залишається на фільтраційному папері. Отриману біомасу висушуємо на апараті Чижової при температурі 105 °С до постійної ваги. Отриману суху біомасу зважуємо на технічних вагах.

#### **8.3.2. Визначення концентрації лікопіну.**

**Відфільтровується біомаса, екстрагується ацетоном, потім ацетоновий екстракт перевіряється спектрофотометрично,**

**УФ-спектроскопічний аналіз.** Для аналізів був використаний ультрафіолетовий спектрофотометр. Відфільтровуємо 100 г культуральної рідини на фільтрувальному папері. Зразок біомаси разом із фільтрувальним папером кладемо в конічну колбу. Ацетон у кількості 250 мл додаємо у колбу із зразком біомаси та ставиться на магнітну мішалку. Після того як ацетон

забарвився в червоний колір (проекстрагував), утворений екстракт фільтруємо на вакуум-фільтрі та заливаємо в кювету. Кювету ставимо у спектрофотометр та порівнюємо з ацетоном, який налитий в іншу кювету. Спектри збирали в діапазоні 400–520 нм і демонстрували за допомогою програмного забезпечення місцевого управління.

### **8.3.3. Визначення концентрації джерела вуглецю.**

Джерелом вуглецю в середовищі для культивування *B. trispora* NRRL 2895 (+) та *B. trispora* I5 (-) є крохмаль, мономером якого є глюкоза.

Концентрацію глюкози визначають після гідролізу крохмалю. Для цього культуральна рідина відбирається в колбу, туди додається соляна кислота. Цю колбу ставимо в термостат, де крохмаль під дією кислоти прогідролізує і ми отримуємо глюкозу.

Перед початком визначення зразок культуральної рідини необхідно прогідролізувати з метою розщеплення крохмалю до глюкози. Для цього в колбу наливаємо 500 мл культуральної рідини, додаємо амілазу і ставимо у термостат за температури 30 °C на 2 години.

Для визначення глюкози використовуємо триелектродну систему, яка поєднала собі робочі та порівняльні електроди.

Вимірювання вмісту отриманої глюкози в культуральному середовищі за допомогою амперометричного біосенсора проводили у 20 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,2, при кімнатній температурі у відкритому об'ємі за інтенсивного перемішування. Визначення концентрації глюкози здійснювали за допомогою методу стандартних додавань. Для проведення аналізу 1 мл проби розводили у 250–1000 разів. Після отримання кожного відгуку сенсор відмивали буферним розчином до стабілізації базового сигналу [78].

### **8.3.4. Визначення концентрації амінного азоту.**

В основі методу К'ельдаля лежить здатність амінокислот утворювати розчинні з'єднання з міддю, кількість якої визначають йодометричним титруванням. Суть методу полягає в тому, що до слабо лужного розчину амінокислот додають надлишок суспензії ортофосфату міді  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  у

боратному буферному розчині. При цьому утворюються розчинні мідні з'єднання. Для їхнього відділення від нерозчинного ортофосфату міді суміш фільтрують. Потім до фільтрату прибавляють оцтову кислоту, яка відщеплює мідь від комплексного з'єднання і перетворюється в ацетат міді.

*Техніка аналізу.* В мірну колбу місткістю 50 см<sup>3</sup> піпеткою вносять 5 см<sup>3</sup> культуральної рідини, додають 3-4 краплини індикатору тімолфталеїну і по краплям розчин гідроксиду натрію концентрацією 0,1 моль/дм<sup>3</sup> до появи блідно-блакитного забарвлення. До слабо лужного розчину із циліндра при перемішуванні порціями обережно приливають 30 см<sup>3</sup> суспензії ортофосфату міді, вміст колби доводять дистильованою водою до мітки, перемішують і фільтрують через паперовий фільтр. Фільтрат повинен бути прозорим.

10 см<sup>3</sup> абсолютно прозорого фільтрату піпеткою переносять в фарфорову чашку або конічну колбу, добавляють 0,5 см<sup>3</sup> 80%-ї оцтової кислоти (підкислюють) і 10 см<sup>3</sup> розчину йодату калію. Після перемішування йод, що виділився, титрують із мікробюретки розчином тіосульфату натрію концентрацією 0,01 моль/дм<sup>3</sup>. В кінці титрування до розчину додають 1-2 краплини розчину крохмалю. Кінець титрування визначають по зникненню синього забарвлення від однієї краплі тіосульфату натрію.

При прийнятому розбавленні кількість амінного азоту в 10 см<sup>3</sup> фільтрату отримують множенням маси тіосульфату натрію, витраченого на титрування, на 0,28. З урахуванням розчинення це відповідає 1 см<sup>3</sup> суслу. Вміст амінного азоту X розраховують за рівнянням [79]:

$$X = \frac{a \times 0,28 \times b \times 10 \times 100}{50} \text{ мг в } 100 \text{ см}^3$$

де а – кількість розчину тіосульфату натрію концентрацією 0,01 моль/дм<sup>3</sup>, витраченого на титрування, см<sup>3</sup> ;

б – об'єм культуральної рідини, взятий на аналіз, см<sup>3</sup>.

Азот не перевіряємо, тому що він знаходиться у надлишку.

#### 8.4. Показники якості лікопіну

#### 8.4.1. Приготування вихідного розчину лікопіну.

Розчиняють 3 мг зразка лікопіну в 20 см<sup>3</sup> дихлорметану, тетрагідрофурану або толуолу, поміщаючи мірну колбу на 30 с в ультразвукову баню.

Розбавляють цей розчин н-гексаном до обсягу 100 см<sup>3</sup>.

Розбавляють 10,0 см<sup>3</sup> отриманого розчину н-гексаном до 100 см<sup>3</sup>.

1 см<sup>3</sup> цього розчину містить 3 мкг лікопіну в суміші н-гексан / дихлорметан (98: 2) (за обсягом), суміші н-гексан / тетрагідрофуран (98: 2) (в об'ємному співвідношенні) або н-гексан / толуол (98:2) (в об'ємному співвідношенні).

Зберігають вихідний розчин в захищеному від світла місці при температурі нижче 4 °С [80].

#### 8.4.2. Перевірка концентрації і чистоти.

Вимірюють оптичну щільність вихідного розчину лікопіну при довжині хвилі 453 нм на спектрофотометрі. Обчислюють масову концентрацію, мкг / см<sup>3</sup>, по формулі:

$$c = \frac{A_{453} \cdot 10^4}{2592}$$

де,  $A_{453}$  - оптична щільність вихідного розчину при максимальній довжині хвилі 453 нм;

2592 - значення коефіцієнта екстинкції  $E_{\frac{1\%}{1\text{ см}}}$  для розчину лікопіну в н-гексані. Воно може мати відчутні відмінності для інших розчинників.

Співвідношення  $A_{455}/A_{340}$  має бути більше 15, а співвідношення  $A_{455}/A_{483}$  повинно знаходитися в діапазоні від 1,14 до 1,18 для чистого лікопіну [80].

#### 8.4.3. Стандартний розчин лікопіну.

Піпеткою відміряють 20 см<sup>3</sup> вихідного розчину лікопіну в круглодонну колбу і видаляють розчинник в умовах зниженого тиску при температурі не вище 50°C. Розчиняють отриманий осад в 20 см<sup>3</sup> розчинника, сумісного з обернено-фазової ВЕРХ.

Стандартний розчин зберігають в захищеному від світла місці при температурі нижче 4°C. Розчин стабільний протягом одного тижня [80].

#### **8.4.4. Ідентифікація**

Ідентифікацію лікопіну проводять шляхом порівняння часу утримування індивідуальних піків на хроматограмах розчину випробуваної проби і стандартного розчину. Ідентифікація піків також можлива шляхом додавання невеликої кількості відповідних стандартних зразків в розчин випробуваної проби.

Поділ і кількісний аналіз є задовільним при дотриманні наступних хроматографічних умов [80]:

*Рухома фаза:*

Ацетонітрил / метанольний розчин ацетату амонію/дихлорметан (в об'ємному співвідношенні 75: 20: 5), з масовою часткою бутилгідрокситолуол 0,1% і триетиламіну 0,05%.

*Швидкість потоку:*

1,5 см / хв;

*Обсяг введеної проби:*

50 мм;

*Детектування:*

450 нм.

#### **8.4.5. Прискорений метод визначення вологості лікопіну на приладі**

##### **Чижової.**

Суть метода полягає у висушуванні наважки досліджуваної речовини між двома нагрітими металевими плитами. Загальний час визначення не перевищує 35-40 хвилин.

*Техніка визначення:*

Виготовляють пакети з цупкого паперу (2 шт на 1 дослід). Нумерують їх простим олівцем. Висушують пакети протягом 3 хвилин при температурі 165-170 °С. Після цього пакети на 5-6 хвилин лишають в ексікаторі для охолодження, а потім зважують на технічних терезах з точністю до 0,01 г.

У сухі пакети зважують приблизно 5 г лікопіну для визначення вологості середньої проби. За можливістю розміщують лікопін у конверті рівним шаром, потім пакет з вологою наважкою зважують і вкладають у прибор Чижової, де пробу висушують при  $t=165-170$  °С впродовж 7 хвилин. Після 5-6 хвилин охолодження в ексикаторі пакети з наважкою знов зважують [80].

Вологість розраховують за формулою:

$$W = \frac{a - b}{a - в} \cdot 100$$

де W- вологість, %;

a – маса пакета з наважкою до висушування, г;

б – маса сухого висушеного пакета, г;

в – маса пакета з наважкою після сушки, г.

З двох пакетів знаходять середнє значення вологості.

## РОЗДІЛ 9. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА

З метою одержання каротиноїду лікопіну, який стабілізує імунний статус організму, поліпшує протікання ряду найважливіших біологічних процесів в організмі, в тому числі нормалізує рівень глюкози в крові, ліпідний обмін, зір і контролює проліферацію (новоутворення) клітин, використовують біомасу *Blakeslea trispora* NRRL 2895 (+) та *B. trispora* I5 (-). Лікопін накопичується всередині клітини, тому для його виділення застосовують процес екстракції органічним розчинником.

Екстракцію лікопіну здійснюють в екстракторі, оснащеному перемішувачем та сорочкою. Апарат виконаний з нержавіючої сталі марки 316 Ті.

Від попередньої стадії підсушену біомасу переносять в апарат та заливають етилацетатом. Для інтенсифікації екстракції процес проводять за температури 65 °С та при постійному перемішуванні зі швидкістю 200 об/хв. Процес триває 2 год.

Регулювання температури відбувається за рахунок подачі гарячої та холодної води в сорочку апарата [51].

					НУХТ БТЕК 04.02.36 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 9. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА		
Розроб.		Гордаш Д. Ю.			Літ.	Арк.	Аркушів
Консультант						123	140
Керівник		Пенчук Ю. М..			Кафедра БТМ		
Зав.кафедри		Пирог Т.П.					

## Завдання на розробку схеми автоматизації

№	Машина, апарат	Параметр, місце відбору сигналу	Допустиме значення параметру	Вид автоматизації	Характер контролю управління	Засоби управління та контролю, реалізація управляючої дії
1	Екстрактор	Температура в апараті	$(65 \pm 1) \text{ } ^\circ\text{C}$	Контроль	Відображення, реєстрація, сигналізація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Вплив на витрату води в сорочку
		Оберти мішалки	200 об/хв, ввімкнено/вимкнено	Управління	Ручне, дистанційне	Пуск, зупинка з АРМа оператора і кнопка «Стоп» по місцю
				Рівень етилацетату в апараті	$(794 \pm 0,2) \text{ л}$	Контроль
		Регулювання	Стабілізація			Вплив на подачу хлороформу
		Кількість біомаси	$(317,6 \pm 0,05) \text{ кг}$	Контроль	Відображення, реєстрація, сигналізація	АРМ оператора
Регулювання	Стабілізація			Вплив на подачу біомаси		
2	Трубопровід води	Витрата води в сорочку екстрактора		Регулювання	Стабілізація	Вплив на температуру в апараті
3	Насос відкачки рідини з екстрактора	Стан насосу відкачки рідини з технологічного апарату	Ввімкнено/вимкнено	Управління	Ручне, дистанційне	Пуск, зупинка з АРМа оператора і кнопка «Стоп» по місцю

## 9.1. Опис функціональної схеми автоматизації

Схема автоматизації ділянки екстракції лікопіну з біомаси складається з регулювання температури, рівня етилацетату, контролю обертів мішалки та кількості біомаси [81].

Від попередньої стадії сушіння суспензії біомаса подається в апарат на конвеєрних вагах (контур 1а). Контроль кількості біомаси здійснює інтегратор для роботи зі стрічковими вагами (контур 1б).

Після внесення 81,3 кг біомаси її подача припиняється та відкривається вентиль подачі етилацетату (контур 2в) в апарат до того, поки не набереться рівень рідини 284,55 л, який фіксуватиме ємнісний датчик рівня (контур 2а). Далі закривається вентиль подачі етилацетату і відкриваються вентиля подачі гарячої та холодної води в сорочку (контур 3г, 3е) для встановлення в апараті температури  $(65 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ , яку вимірює манометричний термометр (контур 3а) і регулює електропневматичний перетворювач (контур 3в) [82].

Після досягнення необхідної температури вмикається перемішувачий пристрій на 2 години зі швидкістю 200 об/хв. По закінченню процесу екстракції мішалка відключається, а суспензія подається на наступну стадію обробки [83].

## 9.2. Специфікація на прилади та засоби автоматизації

Таблиця 9.2

### Специфікація на прилади та засоби автоматизації

Позиція	Параметр	Місце Установки	Найменування характеристика приладу	Тип, модель	Завод виробник
1а	Кількість біомаси	По місцю	Конвеєрні ваги, продуктивністю до 50 т/год, макс. швидкість стрічки до 2 м/с, чутливий елемент – тензодатчик, працює з інтегратором	Mill-tronics MLC	Siemens
1б	Кількість біомаси	По місцю	Інтегратор для роботи зі стрічковими вагами, вихідний сигнал 4–20 мА	Mill-tronics BW100	Siemens
2а	Об'єм етилацетату	По місцю	Ємнісний датчик рівня, матеріал – нержавіюча сталь, діапазон вимірювань 265–4000 мм, макс. допустима	NMC	Kobold

			температура – 125 °С, макс. допустимий тиск – 10 бар, під'єднання – G5/4, аналоговий вихід, точність – 2 мм		
2б	Об'єм етилацетату	На щиті	Електропневматичний розділювач прямої дії, управляючий сигнал 24 В	638М-101-А63	Camozzi
2в	Об'єм етилацетату	На щиті	Пневматичний сідельний клапан серії J4 для нейтрального та агресивного середовища, управляючий сигнал 0–16 бар, розмір G3/8–G2	J4SPG180 5	KRAFTt -AIR
3а	Температура	В агрегаті	Манометричний термометр, матеріал – латунь, робоче середовище – азот, діапазон (0 – 600) °С, макс. допустимий тиск – 25 бар, приєднання G1, клас точності 1,6	TND	Kobold
3б	Температура	По місцю	Температурний нормуючий перетворювач для встановлення у вимірювальну головку, вхідний сигнал термометра опору/ термопари, вихідний сигнал 4–20 мА, напруга живлення – 24 В	НПТ2	ПАО «Тера», Україна
3в	Температура	На щиті	Електропневматичний перетворювач, вхідний сигнал 4–20 мА, вихідний сигнал 20–100 кПа	2713-WP	Dwyer
3г	Температура	На щиті	Пневматичний привід для управління кранами та заслінками, управляючий сигнал 20–100 кПа, крутячий момент 5–30 нм/бар, кут повороту 90°	KUP	Kobold
3г	Температура	На щиті	Електропневматичний перетворювач, вхідний сигнал 4–20 мА, вихідний сигнал 20–100 кПа	2713-WP	Dwyer
3е	Температура	На щиті	Пневматичний привід для управління кранами та	KUP	Kobold

			заслінками, управляючий сигнал 20–100 кПа, крутячий момент 5–30 нм/бар, кут повороту 90о		
КМ2	Оберти мішалки	На щиті	Магнітний пускач, робочий струм – 7 А, потужність двигуна – 3 кВт	3RT2015-IAP01	Siemens
4а	Перекачування на наступну стадію	На щиті	Електропневматичний розподілювач прямої дії, управляючий сигнал 24 В	638M-101-A63	Camozzi
4б	Перекачування на наступну стадію	На щиті	Пневматичний сідельний клапан серії J4 для нейтрального та агресивного середовища, управляючий сигнал 0–16 бар, розмір G3/8–G2	J4SPG180 5	KRAFTt -AIR

## РОЗДІЛ 10. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

### 10.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту та місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів

Технологічна схема біосинтезу лікопіну включає допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва, підготовка і стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу і власне біосинтез).

#### 1. Санітарна підготовка виробництва.

Даний етап включає підготовку мийних та дезінфікуючих засобів для миття обладнання на приміщення. Робочий розчин кальцинованої соди (2 %) готують в установці СІР-мийка. Після використання, відпрацьований розчин кальцинової соди повторно подається у СІР-мийку для повторного використання. Також використовуємо концентрат Гембару (25 %) та дезінфекційний засіб «Дезамін», які після використання надходять до каналізації. *Даний етап є місцем емісії рідких відходів.*

#### 2. Підготування та стерилізація розчинів для титрування.

Етап передбачає приготування 30 % розчину соляної кислоти та розчину гідроксиду натрія. Розчини використовуються для регуляції рН до 6,5 під час культивування в інокуляторі на безпосередньо при біосинтезі у виробничому ферментері. Відходи на даному етапі можуть утворитися лише при помилці під час приготування титрантів. *Тому титранти не включаються у загальний об'єм рідких відходів.*

					НУХТ БТЕК 04.02.36 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 10. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Гордаш Д. Ю.					128	140
Консультант						Кафедра БТМ		
Керівник		Пенчук Ю. М..						
Зав.кафедри		Пирог Т.П.						

#### **4. Приготування та стерилізація поживних середовищ для отримання посівного матеріалу на біосинтезу.**

На даному етапі рідкі відходи можуть виникнути тільки у разі браку під час приготування середовища. Твердими відходами може бути пакувальний матеріал компонентів середовища. *Отже, даний етап є місцем емісії твердих відходів.*

#### **5. Підготовка посівного матеріалу.**

На даному етапі отримується та розмножується посівний матеріал для виробничого біосинтезу у ферментері. *Отже, відходів не може бути.*

Продуцент *Blakeslea trispora* облігатний аероб, тому йому необхідна безперервна подача кисню. Отже, на виході буде велика кількість відпрацьованого повітря. *Blakeslea trispora* – це гриб, який утворює спори. Тому відпрацьоване повітря буде містити аерозоль спор. *Отже, на даний етап є місцем емісії газоподібних відходів.*

#### **6. Виробничий біосинтез.**

На даному етапі маємо культуральну рідину з цільовим продуктом – лікопіном. Оскільки культуральна рідина надходить до фільтр-пресу для фільтрації та подальшого виділення цільового продукту, рідкі відходи на даному етапі не враховуємо. Відпрацьоване повітря буде містити аерозоль спор. *Отже, даний етап є місцем емісії газоподібних відходів.*

#### **7. Фільтрування.**

Культуральну рідину відфільтровують через фільтр-прес для відокремлення біомаси. Оскільки фільтрат у виробництві більше не знадобиться, тому це відходи. *Отже, даний етап є місцем емісії рідких відходів.*

#### **8. Сушіння біомаси.**

Отриману після фільтрування біомасу необхідно висушити до 20% вологості в вакуумній сушарці. При цьому виділяється відпрацьоване повітря, яке містить часточки біомаси. *Отже, даний етап є місцем емісії газоподібних відходів.*

## **9. Екстракція лікопіну.**

Отриману підсушену біомасу поміщають у реакторі з мішалками та проводять екстракцію лікопіну неполярним органічним розчинником – етилацетатом. Екстракт лікопіну переходить на наступний етап виділення, а відходом є утворений ретентант. *Отже, даний етап є місцем емісії твердих відходів.*

## **10. Випарювання органічного екстракту.**

Отриманий органічний екстракт переносять у вакуум-випарну установку та проводять випарювання органічного екстракту в два рази. Упарений екстракт переходить на наступний етап виділення, а утворені пари на утилізацію. *Отже, даний етап є місцем емісії газоподібних відходів.*

## **11. Кристалізація лікопіну.**

Кристалізацію лікопіну з насиченого екстракту проводять при 4 °С упродовж 12 год. *Відходів не передбачається.*

## **12. Фільтрування кристалів лікопіну.**

Кристали лікопіну відфільтровують за допомогою фільтр-пресу. Оскільки фільтрат у виробництві більше не знадобиться, тому це відходи. *Отже, даний етап є місцем емісії рідких відходів.*

## **13. Промивання кристалів лікопіну.**

Отримані кристали промивають органічним розчинником – етанолом при перемішуванні у реакторі за температури 50 °С. Рідкі відходи – етанол. *Отже, даний етап є місцем емісії рідких відходів.*

## **14. Висушування кристалів лікопіну.**

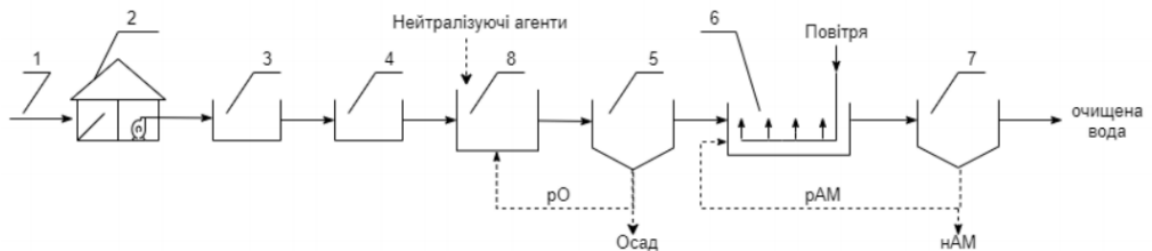
Висушують за допомогою вакуумної сушарки до вологості 0,5%. При цьому виділяється відпрацьоване повітря, яке містить механічні часточки кристалів лікопіну. *Отже, даний етап є місцем емісії газоподібних відходів.*

## **10.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва**

### **10.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів**

Очищення стічних вод відбувається у аеротенках. Але, оскільки, відходи III-го класу небезпеки, потрібно вдатися до додаткової очистки. Скористаємося методом активного мулу, для глибокої утилізації забруднень.

Процес утилізації рідких відходів здійснюється за схемою, яка наведена на рисунку 2.1. В центрі схеми встановлюється камера для змішування стічних з активним мулом і біосорбції. В периферійному відділенні – відстійник. В ньому буде видалятися активний мул з адсорбованими забрудненнями на обробку осадів. В камеру подається лише надлишковий активний мул без додавання флокулянтів [84]. Дана схема може очистити вихідні стоки з ефективністю до 92%.



**Рис. 10.1. Приклади схем очищення промислових стоків целюлозно-паперових фабрик:** 1 - підведення стічних вод; 2-насосна станція; 3-приймальна камера; 4-решітки; 5 – первинний відстійник; 6 - аеротенк; 7 - вторинний відстійник; 8 – усереднювач; рАМ – рециркуляційний активний мул; НАМ – надлишковий активний мул; рО – рециркуляція осаду.

### 10.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів

Поліпропіленові та пластикові тари сортуємо та відправляємо у пункти переробки.

Відпрацьовану біомасу зі слідами ПС та лікопіну можна використовувати як добриво, оскільки лікопін – це всього лише каротиноїд, а солей в ПС було дуже мало.

### 10.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів

Для очищення відходів можна використати абсорбер, але лікопін та його продуцент не мають негативного впливу на довкілля, тому отримані газоподібні відходи можна викинути у довкілля, краще десь у зелених зонах.

### 10.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів.

Для зменшення рідких відходів, розчини Гембару та Дезаміну, як і кальциновану соду, пропускаємо через СІР-мийку, щоб повторно їх використовувати.

## Література:

1. В.Г. Беспалов, И.А. Туманян, В.А. Романов, Н.В. Баракова, А.В. Федоров. Каротиноид ликопин: возможности применения в онкологии и других областях медицины. "Вопросы онкологии". 2019 г.
2. Feng L., Wang Q., Yu X., Kwame F. Effects of exogenous lipids and cold acclimation on lycopene production and fatty acid composition in *Blakeslea trispora*. *J. AMB Express*. 2019; 9: 162. doi: 10.1186/s13568-019-0891-5.
3. Патент № 2270868. Способ получения ликопина, фосфолипидов, жирных кислот и эргостерина путем совместного культивирования (+) и (-) штаммов гриба *Blakeslea trispora*. Авчиева П. Б., Зорина Л. Б., Буторова И. А., Деев С. В., Авчиев М. И. Опубл. 2013-03-23.
4. Sevgili A., Erkmen O. Improved lycopene production from different substrates by mated fermentation of *Blakeslea Trispora*. *J. Foods* 2019 Apr; 8(4): 120. doi: 10.3390/foods8040120.
5. М. И. Авчиев, И. А. Буторова, П. Б. Авчиева. Изучение особенностей роста и накопления ликопина парой гетероталического гриба *Blakeslea trispora* ВСБ-130 (+) и ВСБ – 129 (-). Биотехнология. – 2003. – № 3. – С.12- 19.
6. Е.П. Феофилова, В.М. Терешина, А.С. Меморская, Н.Г. Гончаров, А.И. Алехин, Л.М. Дулькин. Современные представления о биотехнологии получения ликопина из мицелиальных грибов и его медицинском применении. Микология сегодня. Национальная академия микологии. Том 1. М. 2010. С. 314.
7. Wu T., Ye L., Zhao D., Li S., Li Q., Zhang B., Bi C. Engineering membrane morphology and manipulating synthesis for increased lycopene accumulation in *Escherichia coli* cell factories. *J. 3 Biotech* 2018 Jun; 8(6): 269. doi: 10.1007/s13205-018-1298-8.
8. Agar.ua. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://agar.com.ua/index.php?route=common/home>
9. Аспарагін (L). [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://prom.ua/ua/p229749525-asparagin.html>

10. Фосфаты калия E340. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://kiev.flagma.ua/fosfaty-kaliya-e340-o8396741.html>
11. Сульфат магнію. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://prom.ua/ua/p662853117-sulfat-magniya-25kg.html>
12. Сульфат амонію. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://prom.ua/ua/p740939380-sulfat-ammoniya-ammoniumsulfate.html>
13. Натрій фосфорнокислий. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://tehnomya.uaprom.net/p384764695-natrij-fosfornokislyj-zameschennyj.html>
14. Пептон ферментативний. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.systopt.com.ua/ru/pepton-fermentatyvnyj-2/>
15. Тіамін хлорид. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://tabletki.ua/uk/%d0%a2%d0%b8%d0%b0%d0%bc%d0%b8%d0%bd%d0%b0-%d1%85%d0%bb%d0%be%d1%80%d0%b8%d0%b4/10044/>
16. Крохмаль кукурудзяний. [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://natfood.com.ua/specii/pischevye-dobavki/kukuruznyy-krahmal-1kg/?gclid=EA1aIQobChMIyOPN6Iai6AIVA6qWCh3kFAp1EAQYBSABEgKZcPD\\_VwE](https://natfood.com.ua/specii/pischevye-dobavki/kukuruznyy-krahmal-1kg/?gclid=EA1aIQobChMIyOPN6Iai6AIVA6qWCh3kFAp1EAQYBSABEgKZcPD_VwE)
17. Соевий шрот. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://prom.ua/ua/p627573522-soevyj-shrot.html>
18. Бавовняне масло. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://prom.ua/ua/p964840850-maslo-hlopkove-rafinirovannoe.html>
19. Калий фосфорнокислый 1-замещенный, КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> чистый. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://prom.ua/ua/p151620028-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html>
20. Гліцерин. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://prom.ua/ua/p1113664200-glitserin-pischevoj-farm.html>
21. Лимонна кислота. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://prom.ua/ua/p46475444-limonnaya-kislota-meshok.html>
22. Диамонийфосфат. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://him-element.com.ua/20-%D1%84%D0%BE%D1%81%D1%84%D0%B0%D1%82%D0%BD%D1%8B%D0>

[%B5-](#)

[%D1%83%D0%B4%D0%BE%D0%B1%D1%80%D0%B5%D0%BD%D0%B8%D1%8F/p/226-](#)

[%D0%B4%D0%B8%D0%B0%D0%BC%D0%BC%D0%BE%D0%BD%D0%B8%D0%B9%D1%84%D0%BE%D1%81%D1%84%D0%B0%D1%82-%D0%B4%D0%B0%D1%84](#)

23. Патент № 85489. Муколовий гриб *blakeslea trispora* штам pht 1+, pht 1- – продуцент фітоїну. Туриянський Юрій Давидович, Сорока Ярослав Михайлович, Горна Маргарита Степанівна, Тюрєнков Алексей Александрович, Дмитренко Галина Миколаївна, Тюрєнков Владімір Александрович, Стенько Алла Степанівна. Опубл. 26.01.2009.

24. Патент № 2053301С1. Пара штаммов гетероталличного гриба *blakeslea trispora* f - 674(+) и f-551(-), продуцирующая бета-каротин. Е.С. Морозова Л.Г. Васильченко Е.М. Рязанова А.И. Киселева Н.А. Панова Н.В. Воронова. Опубл.: 1996-01-27.

25. *Blakeslea trispora*. Таксономія [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=4850>

26. БАД Эвалар Ликопин [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://irecommend.ru/content/naturalnaya-biologicheski-aktivnaya-dobavka-sokhranyayushchaya-zdorove-i-molodost>

27. Ликопин (Lyc-O-Mato Clinical Trio) 60 капсул. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1124298383-likopin-lyc-mato.html>

28. Ликопин, Lycopene, Now Foods, 120 капсул. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1121705482-likopin-lycopene-now.html>

29. Ликопин, Life Extension. . [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1121705448-likopin-life-extension.html>

30. Ликопин, Lycopene 20 mg, Puritan's Pride . [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p696932983-likopin-lycopene-puritans.html>

31. Лікопін (Lycopene), 21st Century [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://sayyes.com.ua/ua/karotinoidy/4528-likopin-21-century.html>

32. Розподіл постійного населення за статтю, основними віковими групами, співвідношення чоловіків і жінок та середній вік населення в

Україні[Електронний ресурс] – Режим доступу:  
[http://database.ukrcensus.gov.ua/MULT/Dialog/view.asp?ma=3&ti=%D0%EE%E7%EF%EE%E4%B3%EB+%EF%EE%F1%F2%B3%E9%ED%EE%E3%EE+%ED%E0%F1%E5%EB%E5%ED%ED%FF+%E7%E0+%F1%F2%E0%F2%F2%FE%2C+%EE%F1%ED%EE%E2%ED%E8%EC%E8+%E2%B3%EA%EE%E2%E8%EC%E8+%E3%F0%F3%EF%E0%EC%E8%2C+%F1%EF%B3%E2%E2%B3%E4%ED%EE%F8%E5%ED%ED%FF+%F7%EE%EB%EE%E2%B3%EA%B3%E2+%B3+%E6%B3%ED%EE%EA+%F2%E0+%F1%E5%F0%E5%E4%ED%B3%E9+%E2%B3%EA+%ED%E0%F1%E5%EB%E5%ED%ED%FF+%E2+%D3%EA%F0%E0%BF%ED%B3&path=../Quicktables/KEY\\_IND/1/&lang=1&multilang=uk](http://database.ukrcensus.gov.ua/MULT/Dialog/view.asp?ma=3&ti=%D0%EE%E7%EF%EE%E4%B3%EB+%EF%EE%F1%F2%B3%E9%ED%EE%E3%EE+%ED%E0%F1%E5%EB%E5%ED%ED%FF+%E7%E0+%F1%F2%E0%F2%F2%FE%2C+%EE%F1%ED%EE%E2%ED%E8%EC%E8+%E2%B3%EA%EE%E2%E8%EC%E8+%E3%F0%F3%EF%E0%EC%E8%2C+%F1%EF%B3%E2%E2%B3%E4%ED%EE%F8%E5%ED%ED%FF+%F7%EE%EB%EE%E2%B3%EA%B3%E2+%B3+%E6%B3%ED%EE%EA+%F2%E0+%F1%E5%F0%E5%E4%ED%B3%E9+%E2%B3%EA+%ED%E0%F1%E5%EB%E5%ED%ED%FF+%E2+%D3%EA%F0%E0%BF%ED%B3&path=../Quicktables/KEY_IND/1/&lang=1&multilang=uk)

33. Населення України. [Електронний ресурс] – Режим доступу:  
[https://countrysimeters.info/ru/Ukraine#age\\_structure](https://countrysimeters.info/ru/Ukraine#age_structure)

34. Статистика серцево-судинних захворювань. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://112.ua/zdorovie/ot-serdechno-sosudistyh-zabolevaniy-v-mire-za-god-umerlo-18-mln-chelovek-541771.html>

35. Куріння в Україні. [Електронний ресурс] – Режим доступу:  
[http://rb.com.ua/blog/kurenie-v-ukraine/?fbclid=IwAR31Q-4wt8bf7NStWqv2Yb2uUsyZKTaafVXO9SeiT2WCa\\_lvWTJV22WmM0](http://rb.com.ua/blog/kurenie-v-ukraine/?fbclid=IwAR31Q-4wt8bf7NStWqv2Yb2uUsyZKTaafVXO9SeiT2WCa_lvWTJV22WmM0)

36. Кричкова Л.В., Струс О.Е., Половко Н.П. Оптимизация синтеза натурального провитамина биомассой микрогриба. Вестник фармации №2 (36) 2007. – ст. 47.

37. Starch and sucrose metabolism - Reference pathway. [Електронний ресурс] // Режим доступу: [https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?map00500](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00500)

38. Glycolysis / Gluconeogenesis - Reference pathway. [Електронний ресурс] // Режим доступу: [https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?map00010](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00010)

39. Citrate cycle (TCA cycle) - Reference pathway. [Електронний ресурс] // Режим доступу: [https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?map00020](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00020)

40. Terpenoid backbone biosynthesis - Reference pathway. [Електронний ресурс] // Режим доступу: [https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?map00900](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00900)

41. Carotenoid biosynthesis - Reference pathway. [Електронний ресурс] // Режим доступу: [https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?map00906](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00906)

42. Эрлифтные реакторы. Справочник химика. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://chem21.info/info/200761/>

43. Основи проектування біотехнологічних виробництв: Метод. Рекомендації до викон. курс. роботи для студ. Напрямку 6.051401 «Біотехнологія» ден. форм. навч. / Уклад.: Т. П. Пирог, Ю.В Карлаш, В.О Красінько . – К.: НУХТ, 2015. – 10 – 19 с.

44. Фильтр фторопластовый [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://www.polyfilter.ru/produkcziya/filtryi-membrannyie.html>

45. Пирог.Т.П , Игнатова О.А Загальна біотехнологія: - К : НУХТ, 2009 – ст 47-102.

46. Державний реєстр дезінфекційних засобів 2020 рік. [Електронний ресурс] – Режим доступу: [https://moz.gov.ua/uploads/ckeditor/%D0%B4%D0%BE%D0%BA%D1%83%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%B8%D0%94%D0%BE%D1%81%D1%82%D1%83%D0%BF%20%D0%B4%D0%BE%20%D0%BF%D1%83%D0%B1%D0%BB%D1%96%D1%87%D0%BD%D0%BE%D1%97%20%D1%96%D0%BD%D1%84%D0%BE%D1%80%D0%BC%D0%B0%D1%86%D1%96%D1%97/2020\\_%D1%80%D0%B5%D1%94%D1%81%D1%82%D1%80%20%D0%B4%D0%B5%D0%B7%D0%B7%D0%B0%D1%81%D0%BE%D0%B1%D1%96%D0%B21.pdf](https://moz.gov.ua/uploads/ckeditor/%D0%B4%D0%BE%D0%BA%D1%83%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%B8%D0%94%D0%BE%D1%81%D1%82%D1%83%D0%BF%20%D0%B4%D0%BE%20%D0%BF%D1%83%D0%B1%D0%BB%D1%96%D1%87%D0%BD%D0%BE%D1%97%20%D1%96%D0%BD%D1%84%D0%BE%D1%80%D0%BC%D0%B0%D1%86%D1%96%D1%97/2020_%D1%80%D0%B5%D1%94%D1%81%D1%82%D1%80%20%D0%B4%D0%B5%D0%B7%D0%B7%D0%B0%D1%81%D0%BE%D0%B1%D1%96%D0%B21.pdf)

47. Гембар. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://datonal.org/?m0prm=3&m1prm=4&showItem=25>

48. МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ щодо застосування дезінфекційного засобу «Дезамін» з метою дезінфекції, передстерилізаційного очищення та стерилізації. Державна санітарно-епідеміологічна служба України. № 05.03.02-08/850. Київ-2014.

49. Дезінфекції, дезінсекції, дератизація об'єктів отримання та реалізації продуктів тваринного походження [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://medbib.in.ua/dezinfektsiya-dezinseksiyaderatizatsiya-obekto.html>

50. EP2143800B1. Formulations of lycopene and uses thereof. Ana Teresa Marcos Rodríguez, Antonio Estrella De Castro, Javier Costa Pérez, Nieves Fraile Yecora. Publication 2013-06-19. Status Active to 2022-12-20. <https://patents.google.com/patent/EP2143800B1/en>

51. Патент № 2126806С1. Способ получения кристаллического ликопина. А.С. Гаврилов, А.Ф. Ивакин, В.И. Медведева, Н.А. Панова, В.В. Зырянов. Опубл. 27.02.1999 г.

52. Аналіз методів та обладнання для фільтрування та очистки вологих дисперсних матеріалів. Вібрації в техніці та технологіях № 2 (70) 2013 Любин В. С. Іскович-Лотоцький Р.Д. Вінницький національний технічний університет. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://econjournal.vsau.org/files/pdfa/1591.pdf>

53. Як правильно обрати обладнання для зневоднення осаду. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://ua.ekoton.com/kak-pravilno-vybrat-oborudovanie-dlya-obezvozhvaniya-osadkov/>

54. Процеси та апарати харчових виробництв: Підруч. / І. Ф. Малезик, П. С. Циганков, П. М. Немирович, О. С. Марценюк; Ред. І.Ф. Малезик. - К. : НУХТ, 2003. - 400 с.

55. Ткаченко С. Й., Співак О. Ю. Сушильні процеси та установки. Навчальний посібник. - Вінниця: ВНТУ, 2007. - 76 с. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://tkachenko.vk.vntu.edu.ua/file/cda121b838067ae3ea7278d7f3afc556.pdf>

56. Реактор на 50 л [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://prom.ua/p1047766861-reaktor-rsm-dlya.html>

57. Реактор хімічний на 630 л Електронний ресурс: [ режим доступу] : <https://azovchemservice.prom.ua/p227305648-emalirovannyj-reaktor-063mkub.html>

58. Збірник на 160 л Електронний ресурс: [ режим доступу] :  
<https://azovchemservice.prom.ua/p227299353-emalirovannyj-reaktor-himicheskij.html>

59. Збірник на 4000 л Електронний ресурс: [ режим доступу] :  
<https://artox.com.ua/p871166203-reaktor-sern-emalirovannyj.html>

60. Біореактор на 6300 л. Електронний ресурс: [ режим доступу] :  
<https://lavallab.com/products/fermentor-bioreactor/industrial-bioreactors-fermenters/>

61. Біореактор на 630 л . Електронний ресурс: [ режим доступу] :  
<https://www.biotechno.ru/catalog/bioreaktory/promyshlennyy-bioreaktor-500-1000-l/>

62. Біореактор на 63 л . Електронний ресурс: [ режим доступу] :  
<https://www.biotechno.ru/catalog/bioreaktory/pilotnyy-bioreaktor-biotechno-obemom-50-150-l/>

63. Біореактор на 6 л . Електронний ресурс: [ режим доступу] :  
<https://www.biotechno.ru/catalog/bioreaktory/laboratornyy-bioreaktor-pro-lab-s-dvumya-kulturalnymi-sosudami-obemom-7-12-l/>

64. Куц А.М., Бондар М.В., Булій Ю.В. Метод. вказівки до вик. лаб. практикуму студ. заоч. форми навчання напряму підготовки 6.051701 “Харчові технології та інженерія“ спец. “ Технологія продуктів бродіння і виноробства ” / Укл.:. – К: НУХТ, 2011. – 53 с.

65. Дозатори вагові: Електронний ресурс: [ режим доступу] :  
<https://packtech.com.ua/oborudovanie/doziruyushchie/dozatory-sypuchih-produktov/shd-8m5>

66. Насоси фірми ТОВ Ватерпас : Електронний ресурс: [ режим доступу] :  
[https://vaterpass.com.ua/catalog/peristalticheskie\\_nasosyi/seriya\\_ms/ms0](https://vaterpass.com.ua/catalog/peristalticheskie_nasosyi/seriya_ms/ms0)

67. Насоси фірми ТОВ Ватерпас : Електронний ресурс: [ режим доступу] :  
[https://vaterpass.com.ua/catalog/centrobezhnie-nasosi/gigienicheskie\\_nasosyi](https://vaterpass.com.ua/catalog/centrobezhnie-nasosi/gigienicheskie_nasosyi)

68. СІР(СІП)-мойка / СІП-станція. Електронний ресурс: [режим доступу]:  
<https://pivovarni.com.ua/ru/katalog-pivovaren/agregaty/cip-kegomoyka/>

69. ТОВ "ГК ЕВРОХІММАШ К.О." Апарати на замовлення [Електронний ресурс] // Режим доступу: [http://euromash.kiev.ua/ua/aparati\\_perem\\_ustroystvom\\_ua.php](http://euromash.kiev.ua/ua/aparati_perem_ustroystvom_ua.php)

70. Ленточные фильтр-прессы типа ЛМН. [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://hydrotrend.ru/filter-press/belt-filtr-press/>
71. Вакуумна сушильна шафа СВ-30. [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://med-denta.prom.ua/p284148167-vakuumnyj-sushilnyj-shkaf.html>
72. Вакуум-випарний апарат ЭСВА – 250.. [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://zaobmt.com/index.php/industryequipmentlm/144-evaporator.html>
73. Конденсатор: Электронный ресурс: [режим доступа]: [https://bts.net.ua/technological-equipment/teploobmenniki/teploobmenniki\\_shell\\_and\\_tube/capacitor/](https://bts.net.ua/technological-equipment/teploobmenniki/teploobmenniki_shell_and_tube/capacitor/)
74. Насоси фірми ТОВ Ватерпас : Электронный ресурс: [ режим доступа] : [https://vaterpass.com.ua/catalog/centrobezhnie-nasosi/gigienicheskie\\_nasosyi](https://vaterpass.com.ua/catalog/centrobezhnie-nasosi/gigienicheskie_nasosyi)
75. Нутч-фильтры НФП. [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://rusredmet.ru/nutch-filtr-emkostnoy-filtr>
76. Стол производственный Эконом 430. [Электронный ресурс] // Режим доступа: [https://kproekt.com.ua/katalog-produktsii/nejtralnoe-oborudovanie/stoly-proizvodstvennye/stol-proizvodstvennyj-ekonom-430.html?utm\\_source=google\\_search&utm\\_medium=cpc&utm\\_campaign=Nejtral%27noe\\_oborudovanie&utm\\_content=model1&utm\\_term=&gclid=CjwKCAjwjbCDBhAwEiwAiudBywSzDf3KLXJSjWM-nFITs75oszVtskFH0D6R5epdhVXg\\_KUyovojEBoCjPUQAvD\\_BwE](https://kproekt.com.ua/katalog-produktsii/nejtralnoe-oborudovanie/stoly-proizvodstvennye/stol-proizvodstvennyj-ekonom-430.html?utm_source=google_search&utm_medium=cpc&utm_campaign=Nejtral%27noe_oborudovanie&utm_content=model1&utm_term=&gclid=CjwKCAjwjbCDBhAwEiwAiudBywSzDf3KLXJSjWM-nFITs75oszVtskFH0D6R5epdhVXg_KUyovojEBoCjPUQAvD_BwE)
77. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.
78. Горюшкіна Т. Б., Солдаткін О. П., Остроухова В. О., Дзядевич С. В. Оптимізація методики визначення вмісту глюкози у виноматеріалі глюкози у виноматеріалі ензимним амперометричним біосенсором. БІОТЕХНОЛОГІЯ, Т. 2, №1. УДК 577.15:573.6. 2009. – Ст. 89-91.

79. Куц А.М., Бондар М.В., Булій Ю.В. Метод. вказівки до вик. лаб. практикуму студ. заоч. форми навчання напряму підготовки 6.051701 “Харчові технології та інженерія“ спец. “Технологія продуктів бродіння і виноробства” / Укл.: – К: НУХТ, 2011. – 53 с.

80. ГОСТ EN 12823-2-2014. Продукты пищевые. Определение содержания витамина А методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. – Введ. 2017-07-01.

81. Автоматизація виробництва – електронний ресурс. – режим доступу: <http://www.ukr.vipreshebnik.ru/entsiklopediya/19-a/744-avtomatizatsiya-virobnitstva.html>

82. Організація автоматизованого виробництва – електронний ресурс. – режим доступу: [https://pidru4niki.com/13820328/ekonomika/organizatsiya\\_avtomatizovanogo\\_virobnitstva](https://pidru4niki.com/13820328/ekonomika/organizatsiya_avtomatizovanogo_virobnitstva)

83. Проць Я.І., Савків В.Б., Шкодзінський О.К., Ляшук О.Л. Автоматизація виробничих процесів. Навчальний посібник для технічних спеціальностей вищих навчальних закладів. – Тернопіль: ТНТУ ім. І.Пулля, 2011. – 344с.

84. Саблій Л. А. Фізико-хімічне та біологічне очищення висококонцентрованих стічних вод : монографія / Л. А. Саблій. – Рівне : НУВГП, 2013. – 291 с.

# ДОДАТКИ

## Додаток 1.

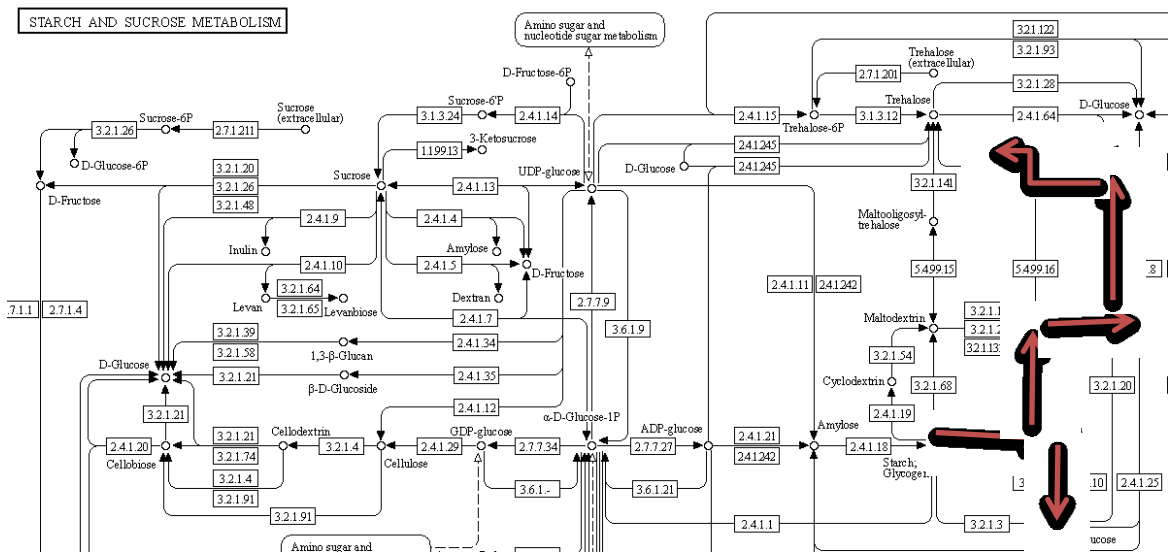
KEGG Search KEGG for Blakeslea trispora Go Clear

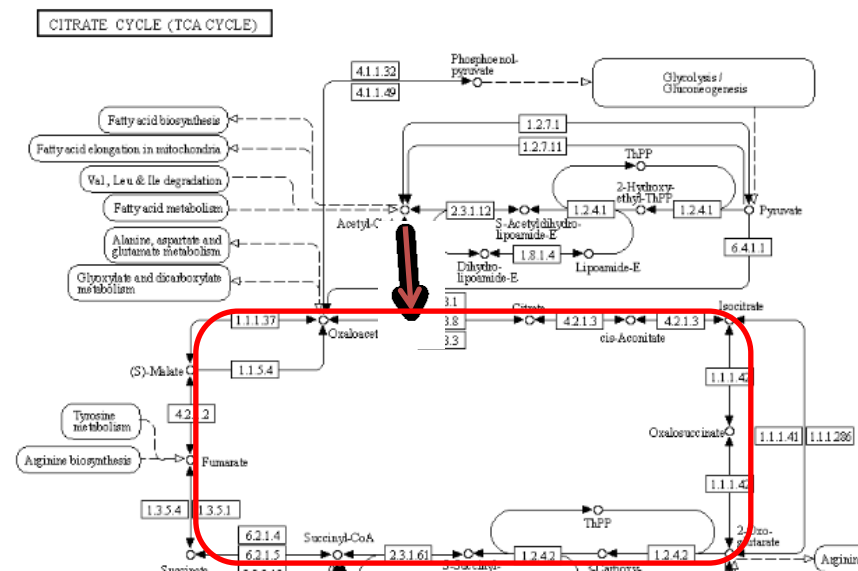
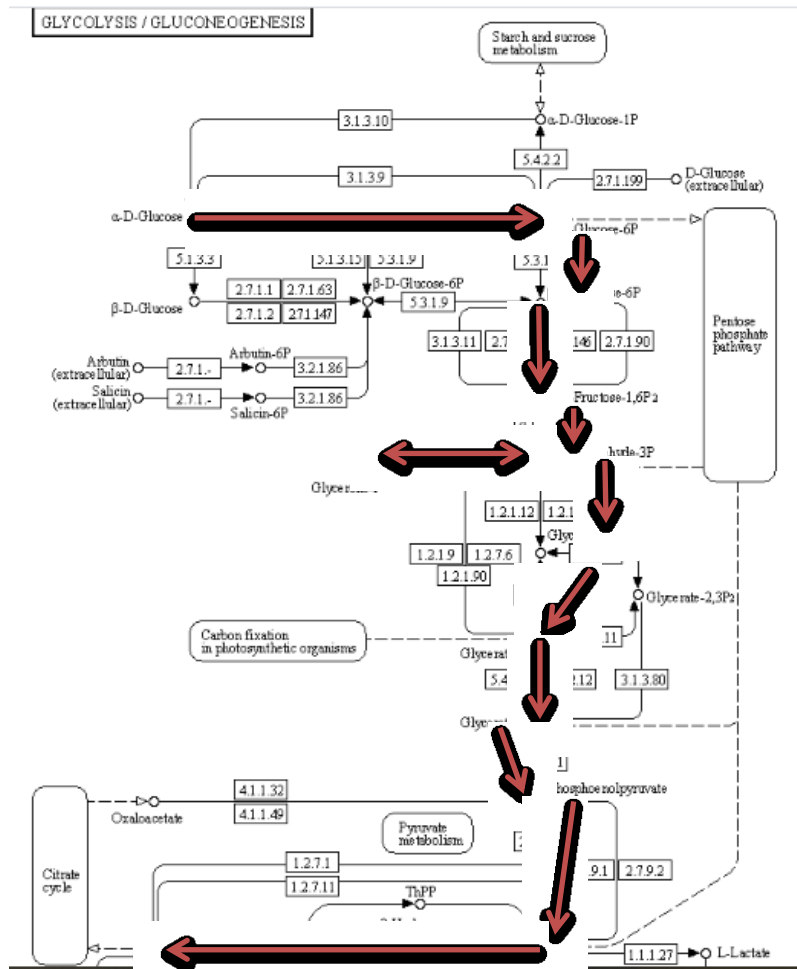
Database: KEGG - Search term: Blakeslea trispora

NO ENTRY FOUND.

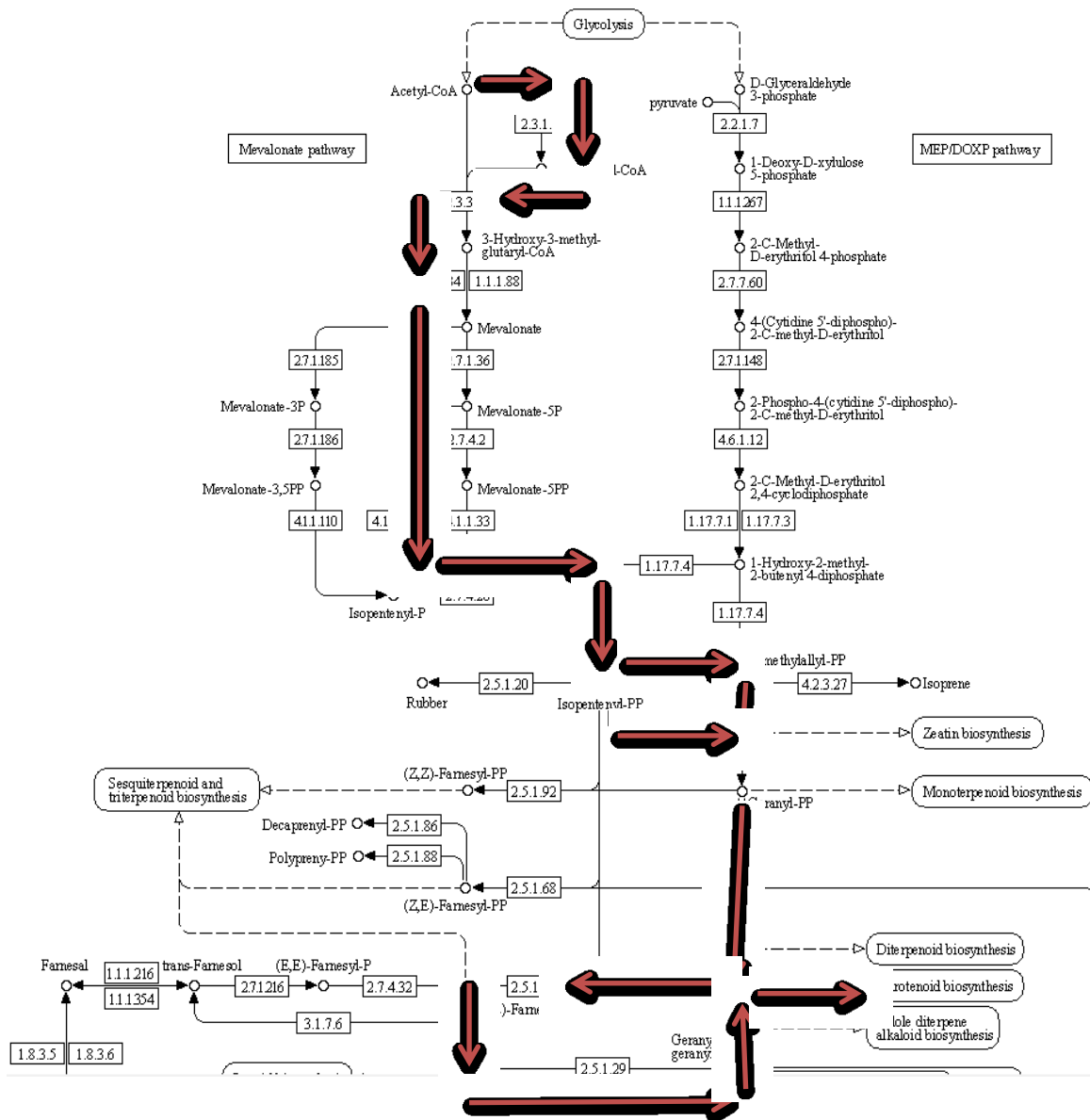
DBGET integrated database retrieval system

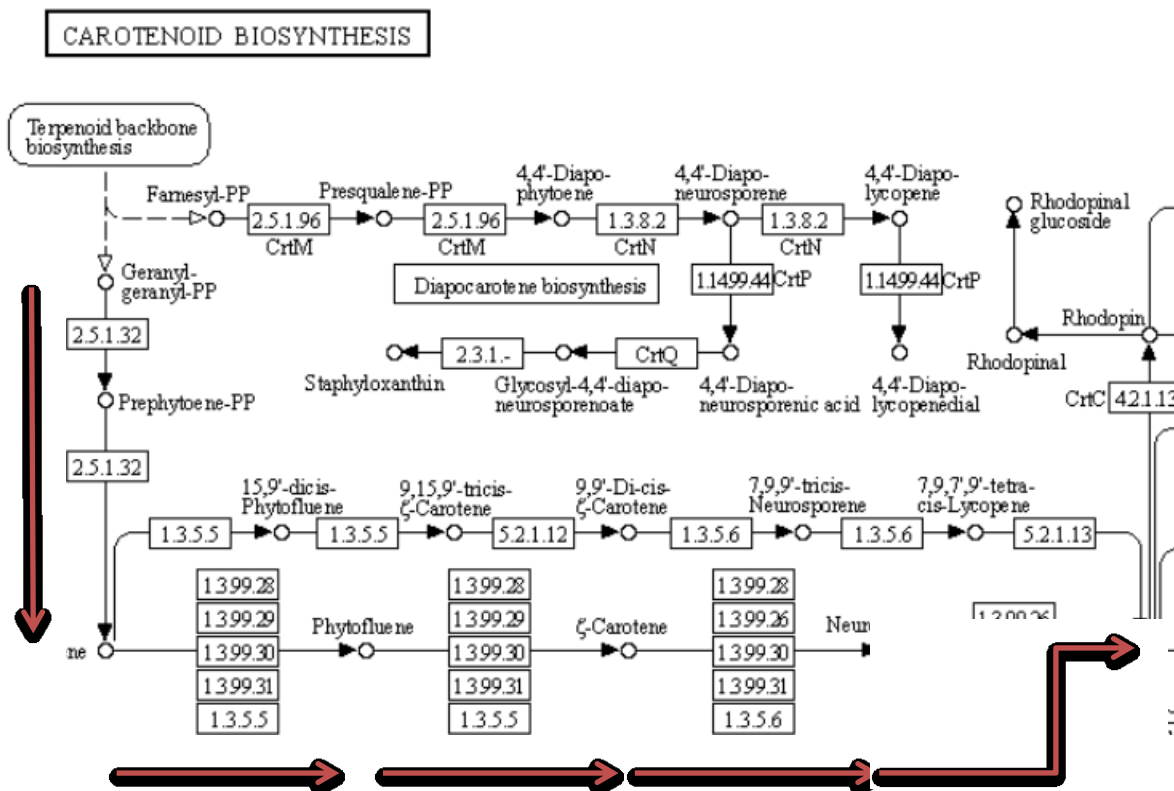
## Додаток 2.



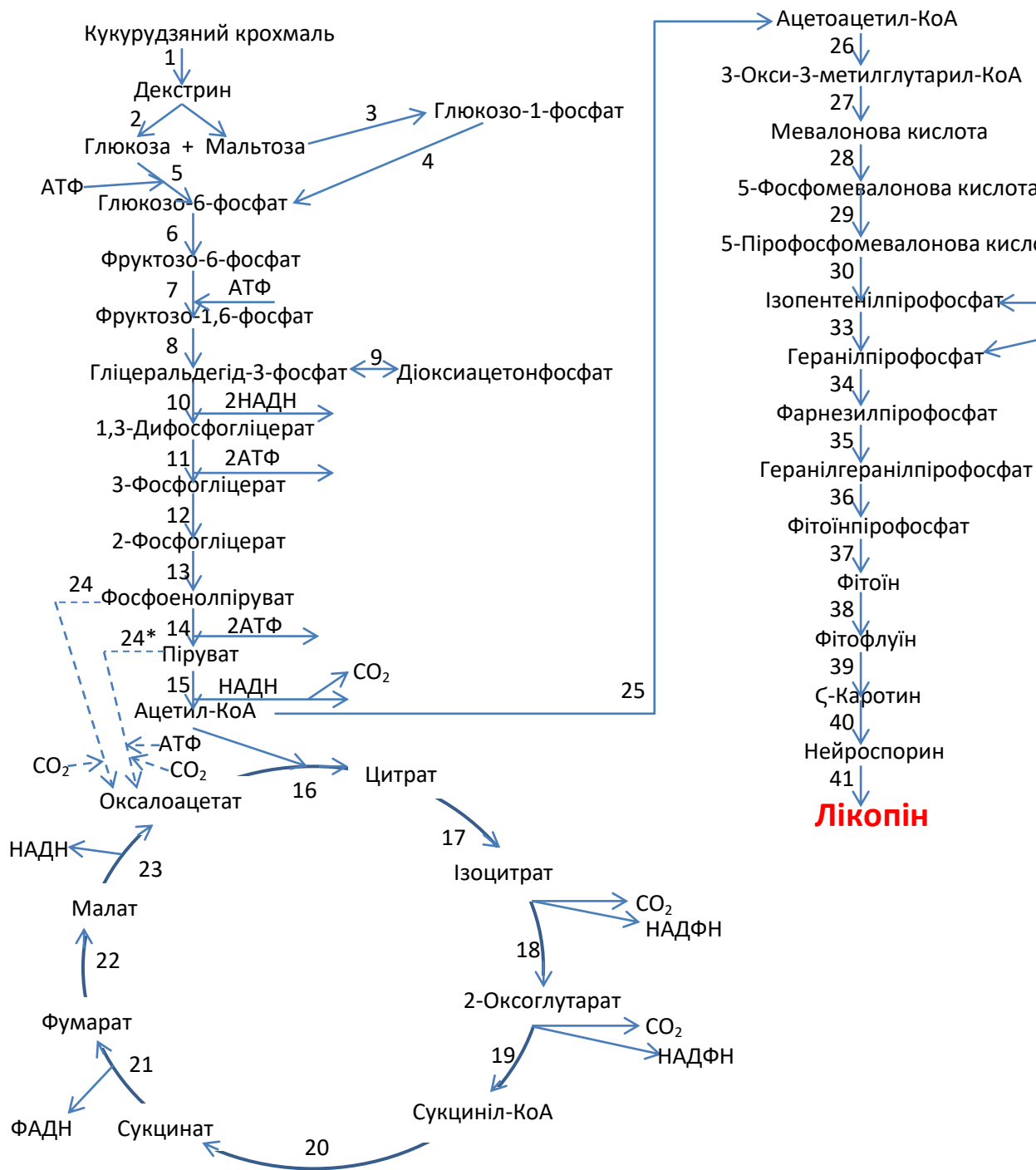


TERPENOID BACKBONE BIOSYNTHESIS





**Схема біосинтезу лікопіну за допомогою *B. trispora* NRRL 2895 (+) та *B. trispora* I5 (-) при рості на кукурудзяному крохмалі**



**Ферменти:** 1 - амілаза (КФ: [3.2.1.2](#)); 2 - мальтозоглюкоамілаза (КФ: [3.2.1.3](#)); 3 - мальтозофосфорилаза (КФ: [2.4.1.8](#)); 4 - фосфоглюкомутаза (КФ: [5.4.2.6](#)); 5 - глюкокіназа (КФ: [2.7.1.2](#)); 6 - глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ: [5.3.1.9](#)); 7 - 6-фосфофруктокіназа (КФ: [2.7.1.11](#)); 8 - фруктозобіфосфатальдолаза, клас II (КФ: [4.1.2.13](#)); 9 - триозофосфатізомераза (КФ: [5.3.1.1](#)); 10 - гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ: [1.2.1.12](#)); 11 - фосфогліцераткіназа (КФ: [2.7.2.3](#)); 12 - 2,3-біфосфатзалежна фосогліцератмутаза (КФ: [5.4.2.11](#)); 13 - енолаза (КФ: [4.2.1.11](#)); 14 - піруваткіназа (КФ: [2.7.1.40](#)); 15 - дигідроліпоаміддегідрогенази (КФ: [1.8.1.4](#)); 16 - цитратсинтаза (КФ: [2.3.3.1](#)); 17 - аконітатгідратаза (КФ: [4.2.1.3](#)); 18 - ізоцитратдегідрогеназа (КФ: [1.1.1.42](#)); 19 - дигідроліпоаміддегідрогенази (КФ: [1.8.1.4](#)); 20 - сукциніл-КоА синтетаза, альфа-субодиниця (КФ: [6.2.1.5](#)); 21 - сукцинатдегідрогеназа, цитохром b 556 субодиниця; 22 - фумаратгідратаза, клас II (КФ: [4.2.1.2](#)); 23 - малатдегідрогеназа (КФ: [1.1.1.37](#)); 24 - фосфоенолпіруваткарбоксілаза (КФ: [4.1.1.31](#)); 24\* - піруваткарбоксілаза (КФ: [6.4.1.1](#)); 25 - ацетил-КоА С-ацетилтрансфераза (КФ: [2.3.1.9](#)); 26 - гідроксиметилглутаріл-КоА синтаза (КФ: [2.3.3.10](#)); 27 - гідроксиметилглутаріл-КоА редуктаза (КФ: [1.1.1.88](#)); 28 - мевалонат-кіназа (КФ: [2.7.1.36](#)); 29 - фосфомевалонаткіназа (КФ: [2.7.4.2](#)); 30 - пірофосфомевалонат-декарбоксілаза(КФ: [4.1.1.33](#)); 31 - ізопентеніл-пірофосфат-ізомераза (КФ: [5.3.3.2](#)); 32, 33 - диметилалілтрансфераза (КФ: [2.5.1.1](#)); 34 - фарнезилдифосфатсинтаза (КФ: [2.5.1.10](#)); 35 - геранілгеранілдифосфат синтаза, тип III (КФ: [2.5.1.29](#)); 36, 37 - 15-цис-фітоїнсинтаза (КФ: [2.5.1.32](#)); 38, 39 - 15-цис-фітоїндесатураза (КФ: [1.3.5.5](#)); 40, 41 - цета-каротинова десатураза (КФ: [1.3.5.6](#)).

## ORIGINAL ARTICLE

## Open Access



# Effects of exogenous lipids and cold acclimation on lycopene production and fatty acid composition in *Blakeslea trispora*

Feng Lingran<sup>1</sup>, Wang Qiang<sup>1\*</sup>, Yu Xiaobin<sup>2</sup> and Fred Kwame<sup>2</sup>**Abstract**

Exogenous lipids serving as stimulators to improve lycopene production in *Blakeslea trispora* have been widely reported. However, the selection basis of exogenous lipids and their effects on intracellular lipids are not very clear. In this study, five plant oils with different fatty acid compositions were selected to investigate their effects on lycopene production, fatty acid composition and the desaturation degree of intracellular lipids. Among the oils, soybean oil, with a fatty acid composition similar to that of mycelium, exhibited the best stimulating effect on lycopene formation (improvement of 82.1%). The plant oils enhanced the total content of intracellular lipids and the desaturation degree of reserve lipids due to the alteration of fatty acid composition, especially in neutral lipids. Lycopene production was increased with the improved desaturation degree of intracellular lipids, which may be attributed to the enhancement of storage capacity for lycopene in storage lipid, thus reducing the feedback regulation of free lycopene. In addition, the increase of the desaturation degree of reserve lipids through temperature-changing fermentation also enhanced lycopene production. The present study could serve as a basis for a better understanding of the relationship between the fatty acid composition of reserve lipids and lycopene production.

**Keywords:** Lycopene, Cold acclimation, Exogenous lipids, *Blakeslea trispora*

**Introduction**

Lycopene, a member of the carotenoids, has been widely applied in the pharmaceutical, feed, and food industries (Feofilova et al. 2006; Nelis and Leenheer 1991). Increasing evidence supports the role of lycopene against some diseases, such as cardiovascular diseases and prostate cancer (Khachik et al. 2002; Story et al. 2010). Lycopene can be synthesized by chemical pathways, plants and microorganisms. Compared with chemical synthetic lycopene, natural-origin lycopene extracted from plants (mainly tomato) and microorganisms (mainly *B. trispora*) has a broader market due to the increasing consumer demand for “all natural” products, although synthetic and natural lycopene have identical bioavailability in humans (Hoppe et al. 2003; Papaioannou et al. 2016). The main

advantages of natural lycopene are more eco-friendly and safe to human compared with synthetic lycopene (Martínez-Cámara et al. 2018). Natural lycopene is approved for coloring matters within European Union and FDA, but chemical synthetic lycopene is not permitted. Moreover, the consumer perception that “natural is good” has been motivating the increase of natural lycopene markets. Although plant-origin lycopene still prevails in the current lycopene market, microbial lycopene has been commercialized by some companies employing the fungus *B. trispora*, such as Vitatene (Leon, Spain) and the North China Pharmaceutical Group (Shijiazhuang, China). Compared with plants, microorganisms have the advantages of a rapid growth rate, controllable conditions, and a high purity and percentage of lycopene in cells (López-Nieto et al. 2004). *B. trispora*, a zygomycota fungus with two mating types (termed ‘plus’ and ‘minus’), occupies a prominent place among microbial producers of lycopene. Lycopene is an intermediate of the carotenoid biosynthetic pathway in *B. trispora* strains. To obtain lycopene,

\*Correspondence: wangqiang@htu.edu.cn

<sup>1</sup> College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China

Full list of author information is available at the end of the article

either a cyclase inhibitor, i.e., 2-methylimidazole (Pegklidou et al. 2008), or genetic means is required to prevent the formation of  $\beta$ -carotene and promote the accumulation of lycopene. Similar to plant origins, lycopene configurations in *B. trispora* mainly consist of all-*trans* forms (> 90%), although lycopene in vitro can isomerize to the mono or poly-*cis* form under heating or light (Authority 2005; Shi 2000).

The low yield of the final product is one of the main limitations of lycopene production by *B. trispora*. Numerous studies revealed that mutation breeding (Mehta et al. 2003; Rodriguez et al. 2009), various stimulants (Bhosale 2004; Shi et al. 2012; Wang et al. 2012), and process optimization (Mantzouridou et al. 2005, 2002; Mantzouridou and Naziri 2017) have been successfully used for enhancing lycopene production. Growth and lycopene synthesis are known to be stimulated by vegetable oils with high contents of linoleic and especially linolenic acids (Nanou and Roukas 2016; Sevgili and Erkmen 2019). The addition of plant oils improved the content of cellular unsaturated triacylglycerol in *B. trispora* compared with that obtained using glucose as the sole carbon source (Mantzouridou and Tsimidou 2007). Theoretically, exogenous lipids can be used for (a) synthesizing intracellular compounds and obtaining energy and (b) the biosynthesis of both lycopene and cellular lipids because they use acetyl-CoA (resulting from lipid degradation) as a common precursor substance. The catabolism of lipids promotes glucose towards the hexose monophosphate pathway (HMP) due to intracellular energy excess, hence increasing the production of NADPH. Thus, cellular lipid and lycopene synthesis can be stimulated because the biosynthesis and desaturases of both carotenoids and aliphatic chains require NADPH as co-factors (Beyer et al. 1994; Garba et al. 2017; Mizioro 2011). However, the effects exogenous lipids on intracellular lipids and the relationship between cellular fatty acid composition and lycopene production are not very clear.

Several modes of change of cellular fatty acids at varying environmental temperatures have been found in fungi, yeasts and bacteria, such as the degree of fatty acid unsaturation, fatty acid chain length, and cellular fatty acid content. The main change reflects the degree of unsaturation of fatty acyl chains through the control of fatty acid desaturation both at the level of transcription and post-transcriptional regulation (Dyer et al. 2001; Gargano et al. 1995; Vigh et al. 2005). Remodeling of membrane composition and functionality to maintain proper cellular function is widely accepted and termed homeoviscous adaptation (Cossins 1994). In addition to phospholipids, *B. trispora* also reserves large amounts of neutral lipids in lipid bodies where lipophilic carotenoids are deposited. It has been shown that hypothermic

conditions can result in (a) an increase in the degree of desaturation of fatty acids in the lipid bilayer and (b) changes in the qualitative and quantitative composition of neutral lipids (Feofilova et al. 2000). Feofilova et al. (2005) showed that the degree of desaturation of fatty acids of both (+) and (–) strains of *B. trispora* increased in the lipid bilayer, although the (–) strain lacks linolenic acid.

Plant oils are known to improve the lycopene production and biomass of *B. trispora*. However, their effects on intracellular fatty acid composition and the selection basis of exogenous plant oils are not very clear. In this work, the lipid composition and lycopene production of *B. trispora* in response to different exogenous plant oils and temperature variation were investigated. The aims were to reveal the effects of several common plant oils on intracellular lipids and the relationship between cellular fatty acid composition and lycopene production. Based on these findings, lycopene production could be improved by altering the intracellular fatty acid composition of *B. trispora*, such as by adding suitable plant oils, changing the fermentation temperature, and adjusting other culture conditions.

## Materials and methods

### Microorganisms and culture conditions

The microorganisms used in this study were *B. trispora* NRRL 2895 mating type (+) and *B. trispora* 15 mating type (–). The strain 15, which presents a super yellow colony color and lovastatin resistance, was a high-yield lycopene mutant of *B. trispora* NRRL 2896 mating type (–) (Wang et al. 2013). The strains were grown on potato dextrose agar medium at 25 °C for 4 days and thereafter subcultured every 30 days. The spores obtained were suspended in 10 mL of sterile water to prepare the inocula. Spore suspensions containing  $2.0 \times 10^5$  and  $1.0 \times 10^6$  spores/mL of the strains NRRL 2895 and 15 was transferred to 250-mL conical flasks, each containing 50 mL of seed medium. The flasks were cultivated on a rotary shaker with an agitation rate of 200 rpm at 25 °C for 48 h. The seed medium (g/L) contained: corn starch 30, soybean meal 50,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 and thiamine-HCl 0.002, and the pH was adjusted to 6.5. All medium components were sterilized at 121 °C for 20 min.

### Fermentation conditions

Fermentation was carried out in 250-mL flasks with 25 mL of media (three replicas of each treatment) and 10% (v/v) inoculum containing a 1:5 (v/v) mixture of each seed broth grown separately. The fermentation medium (g/L) contained: corn starch 50, soybean meal 25, cottonseed oil 40,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 and thiamine-HCl 0.002, and the pH was adjusted to 6.5. All

medium components were sterilized at 121 °C for 20 min. The flasks were cultivated on a rotary shaker with an agitation rate of 200 rpm at 25 °C. A cyclase inhibitor, i.e., 2-methylimidazole, was added at a concentration of 0.3 g/L after 48 h of fermentation (Pegklidou et al. 2008). Cultures were maintained for 120 h, and then the cells were harvested to determine the dry cell weight and lycopene content.

#### Temperature-changing fermentation

To evaluate the effect of different culture temperature on the growth of *B. trispora*, the inoculated flasks were cultivated at different constant temperature that as follows: 16, 18, 20, 22, 24, 26, and 28 °C. Cultures were maintained for 120 h, and then the cells were harvested to determine the dry cell weight.

To obtain the time course of lycopene concentration and dry biomass by *B. trispora* under constant temperature and varying temperature, the experiments were designed as follows. 72 inoculated flasks were divided into two groups: constant temperature and varying temperature. During constant-temperature fermentation, the temperature was maintained at 25 °C until the end. During temperature-changing fermentation, the culture process was divided into three phases: phase I for the first 84 h, phase II for the following 24 h, and phase III for the last 36 h. The temperatures were maintained at 25 °C for phase I and phase III, and 20 °C for phase II. Every 12 h interval, three flasks of each group were taken out to determine the lycopene concentration and dry cell weight. In addition, the samples collected from the varying temperature group at 72, 96 and 120 h were simultaneously used to determine the fatty acid composition of intracellular lipid of *B. trispora*.

#### Lipid and fatty acid analysis

At appropriate time intervals, a 10-mL sample was collected from the culture broth and then centrifuged at 10,000×g for 20 min. The sediment was disrupted by freezing in liquid nitrogen and subsequently thawing and disintegrating with quartz sand. Lipid was extracted by using a chloroform–methanol (2:1) mixture that was stirred on a magnetic mixer. Lipid extracts were separated on thin-layer chromatography plates (20 × 20 cm) coated with silica gel 60, using solvents with different degrees of polarity (Nichols 1963). Neutral lipids (NL) were separated using the solvent system hexane-ether-acetic acid (85:15:1). Phospholipids (PL) were separated using two solvent systems successively in the same direction: hexane–ether–acetic acid (85:15:1) and chloroform–methanol–acetic acid–water (25:15:4:2). Glycolipids (GL) were separated using the

solvent system chloroform–methanol–water (65:15:2). The lipid fractions containing NL, PL, GL were scraped off the plates for fatty acid analysis, respectively. Lipid classes were visualized by iodine vapor and identified by comparison of their  $R_f$  values with those of known standards (Sigma). Individual lipid classes were relatively quantified by a densitometer. Fatty acid methyl esters (FAMES) were prepared as described by Lepage and Roy (1984) and then analyzed using a gas chromatography mass spectrometry (Thermo Scientific TQ 8000, USA) equipped with a Supelco SPB-50 capillary column (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm). The column temperature was programmed using the gradient mode starting at 110 °C maintained for 3 min, then gradually increasing to 220 °C at a rate of 20 °C min<sup>-1</sup> and maintaining the latter temperature for 25 min. The temperature of the injector and detector were maintained at 250 and 260 °C, respectively. Samples (1 μL) were injected with a split ratio of 50:1 by the autoinjector. Helium was used as a carrier gas. The ion source and ion source surface temperatures were set to 200 °C and 250 °C, respectively. Electron impact ionization (70 eV) in scan mode ( $m/z$  60–600) at a rate of 20 scans/s was used. Mass spectra of all detected compounds were compared with spectra in the NIST library 2.0 (2008 version) and the in-house mass spectra library database established by Umea Plant Science Center. Individual fatty acids were identified by comparing their retention times with those of known FAME standards (Sigma). Nonadecanoic acid (C19:0) was used as an internal standard. Fatty acid amounts were relatively quantified by calculating their chromatographic peak areas.

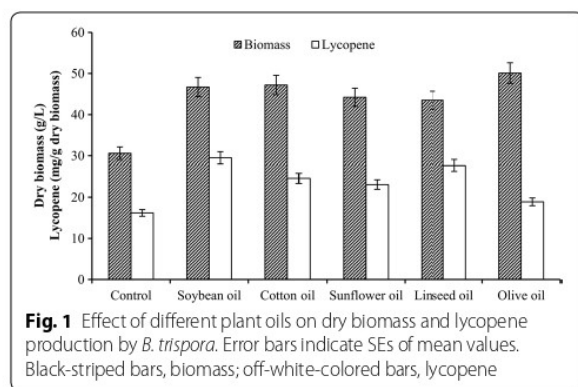
#### Extraction and analysis of lycopene

After 120 h, a 10-mL sample was collected from culture broth and then centrifuged at 10,000×g for 20 min. The sediment was washed with distilled water and recentrifuged (triple). Dry biomass weight was determined after drying at 105 °C overnight. To measure lycopene content, the sediment was dried in a vacuum drier at 40 °C and then crushed using mortar and pestle, followed by extraction of lycopene with petroleum ether. Repeated extractions of lycopene were carried out with the above solvent until the residue became colorless. Lycopene produced was analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC). The HPLC was equipped with a ZORBAX Eclipse Plus C18 column (250 mm × 4.6 mm) at 30 °C. The mobile phase was acetonitrile: acetone (60:40, v/v) at a flow rate of 1 mL/min. The absorption of lycopene was measured at 470 nm. Lycopene was identified by comparing with the retention time of lycopene standard (Sigma),

and quantitative analysis was performed by the single-point calibration method.

**Statistical analysis**

The reported data are mean values of three independent experiments. Statistical differences between different treatments (groups) were determined by analysis of variance (ANOVA) and Tukey’s post hoc test. Results were considered significant when differences had values of  $p < 0.05$ . Pearson’s correlation was used to analyze the relationships between the solubility of lycopene and the desaturation degree of plant oils. All statistical analyses were performed with SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois).



**Fig. 1** Effect of different plant oils on dry biomass and lycopene production by *B. trispora*. Error bars indicate SEs of mean values. Black-striped bars, biomass; off-white-colored bars, lycopene

**Results**

**Effect of exogenous lipids on dry biomass and lycopene production**

According to the available literature, the lipids of *B. trispora* grown in media with glucose or corn flour predominantly contained palmitic (C<sub>16:0</sub>), stearic (C<sub>18:0</sub>), oleic (C<sub>18:1</sub>), linoleic (C<sub>18:2</sub>), and linolenic (C<sub>18:3</sub>) fatty acids (Tereshina et al. 2005, 2010; Vereschagina et al. 2010). When corn starch was used as the main carbon source, the effects of the oils used in this study on total lipids, dry biomass, and lycopene production are shown in Fig. 1. In the presence of oils, these three parameters were increased relative to those without oil. Soybean oil was more effective in stimulating lycopene formation (40.1 mg/g) than other oils ( $p < 0.05$ , ANOVA analysis and Tukey’s post hoc test). The highest volumetric production (1.3 g/L) was obtained in the presence of soybean oil ( $p < 0.01$ , ANOVA analysis and Tukey’s post hoc test). The fatty acid compositions of the oils were determined by assessing fatty acid profiles (Table 1). These plant oils largely contained saturated palmitic and stearic fatty acids and unsaturated oleic, linoleic, and linolenic fatty acids. Among these oils, the highest contents of palmitic, oleic, linoleic, and linolenic fatty acids were found in cotton, olive, soybean, and linseed oils, respectively ( $p < 0.05$ , ANOVA analysis and Tukey’s post hoc test). The contents of stearic acid in these oils were not significantly different ( $p > 0.05$ , ANOVA analysis and Tukey’s post hoc test).

**Table 1** Effect of plant oils on the fatty acid composition of intracellular lipids of *B. trispora*

	Control			Soybean oil			Olive oil			Linseed oil		
	NL	PL	GL	NL	PL	GL	NL	PL	GL	NL	PL	GL
C <sub>14:0</sub>	2.9 <sup>a</sup>	2.5	10.5	3.3	1.0	8.6	3.5	1.8	9.7	3.0	2.1	9.1
C <sub>15:0</sub>	–	–	–	–	0.4	–	–	–	0.6	–	–	0.5
C <sub>16:0</sub>	21.3	22.8	18.9	10.7	15.1	12.9	12.4	18.8	13.5	11.5	21.0	14.5
C <sub>16:1</sub>	0.3	–	0.3	0.5	–	0.5	0.4	–	0.6	–	–	0.4
C <sub>17:0</sub>	–	3.2	–	1.0	1.7	–	–	1.5	–	–	1.5	–
C <sub>18:0</sub>	15.1	5.0	19.5	6.2	3.3	14.8	8.0	3.8	12.7	8.7	4.7	14.3
C <sub>18:1</sub>	21.9	21.2	21.1	25.1	20.5	24.5	56.3	29.7	30.5	20.5	19.7	23.4
C <sub>18:2</sub>	34.3	44.8	27.2	46.5	47.3	33.0	12.4	42.9	26.3	26.3	45.9	30.2
C <sub>18:3</sub>	1.9	0.5	–	4.1	0.7	–	4.0	0.7	–	18.5	4.7	3.5
C <sub>20:0</sub>	0.8	–	–	0.5	0.4	0.6	0.7	–	0.5	0.7	–	0.4
C <sub>20:1</sub>	1.0	–	1.8	0.4	–	3.5	0.6	–	3.0	–	–	0.5
C <sub>20:2</sub>	–	–	–	–	–	0.4	1.0	0.8	1.7	0.5	0.4	1.5
C <sub>20:3</sub>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.4
C <sub>20:4</sub>	–	–	0.4	–	–	0.3	–	–	0.5	–	–	0.3
C <sub>22:0</sub>	0.5	–	0.3	0.7	–	0.5	0.7	–	–	–	–	0.5
C <sub>22:1</sub>	–	–	–	–	–	0.4	–	–	0.4	–	–	0.5
Desaturation degree	0.98	1.12	0.79	1.31	1.17	0.97	0.96	1.19	0.93	1.30	1.26	1.01

<sup>a</sup> All value mean the relative content of fatty acids, % of lipid fraction

**Effect of plant oils on fatty acid composition of cellular lipids**

To further investigate the influence of oil on lycopene synthesis, the fatty acid compositions of the NL, PL, and GL of the mycelium in the presence of different oils were assayed. Based on the composition analysis of plant oils, unsaturated fatty acids showed a positive influence on lycopene production. Three plant oils (soybean, linseed, and olive oils) with significantly different degrees of unsaturation were chosen for further analysis ( $p < 0.01$ ). Meanwhile, their effects on lycopene production also showed significant differences ( $p < 0.01$ ). The results are shown in Table 1. The overall trend of fatty acid composition in the presence of oils was an increase in unsaturated fatty acids against a decrease in saturated fatty acids relative to the compositions without oil. This resulted in an increase in the desaturation degree of fatty acids of the NL, PL, and GL of the mycelium. Unlike the strong influence of soybean and linseed oils on the desaturation degree of fatty acids, olive oil was relatively weak. This may be attributed to the difference in the fatty acid compositions of these three oils. The relative contents of the lipid fractions and the total lipid contents in the mycelium in the presence of different oils are shown in Table 2. Both NL and total lipid were increased in the presence of oils compared with those without oil. The percentage increase of NL in lipid fractions was not measured against the background of the decreased

absolute contents of PL and GL. This is due to the significant increase in the absolute content of NL compared with the slight increase in PL and GL.

**Solubility of lycopene in different plant oils**

The fatty acid compositions of intracellular lipid have some similarities with that of plant oils. Therefore, to explore the influence of the fatty acid composition of intracellular lipid on the solubility of lycopene in mycelium, the solubilities of lycopene in different plant oils were determined. As Fig. 2 shows, linseed oil exhibited the highest solubility value, which was two times higher than secondary soybean oil. Olive oil showed the lowest solubility value. In addition, there was a positive correlation between the solubility of lycopene and the desaturation degree of plant oils (pearson correlation,  $R^2 = 0.972$ ,  $p < 0.01$ ).

**Effects of temperature variation on dry biomass and lycopene production**

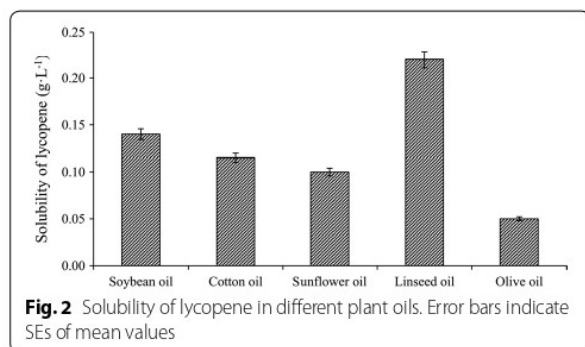
It has been shown that cold acclimation can alter fatty acid composition in intracellular lipids, especially the degree of unsaturation of fatty acyl chains. Therefore, the effects of temperature variation on lycopene production and fatty acid composition were investigated, with the aim of providing support for the correlation between lycopene production and the desaturation degree of intracellular lipids. As shown in Fig. 3, the growth of *B. trispora* was

**Table 2** Effect of culture temperature on fatty acid composition of intracellular lipid of *B. trispora*

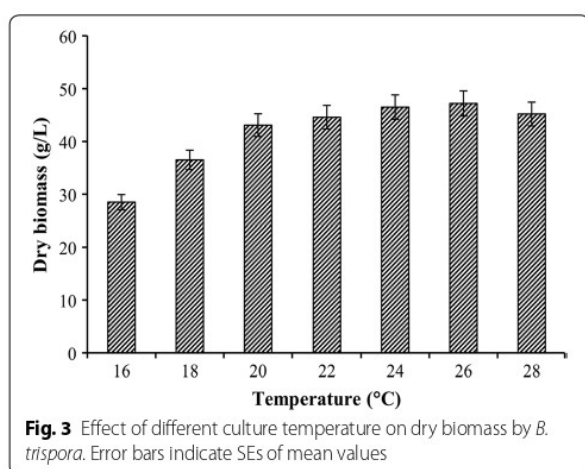
	Phase I <sup>a</sup>			Phase II			Phase III		
	NL	PL	GL	NL	PL	GL	NL	PL	GL
C <sub>14:0</sub>	3.5 <sup>b</sup>	2.5	8.7	1.2	0.5	6.1	3.0	2.7	7.2
C <sub>15:0</sub>	–	–	–	–	–	0.5	–	0.3	0.3
C <sub>16:0</sub>	15.4	20.8	18.5	3.0	7.8	7.2	7.2	18.4	17.1
C <sub>16:1</sub>	0.5	–	0.3	0.6	–	–	0.7	–	–
C <sub>17:0</sub>	1.2	3.2	–	0.8	0.4	0.4	0.8	3.0	0.7
C <sub>18:0</sub>	18.2	4.7	11.2	9.0	2.5	9.1	12.8	5.8	11.1
C <sub>18:1</sub>	23.8	21.5	24.0	32.2	33.2	31.2	24.5	20.5	26.4
C <sub>18:2</sub>	33.2	46.8	33.6	48.4	55.2	37.9	43.2	47.6	35.4
C <sub>18:3</sub>	2.4	0.5	–	3.0	4.6	–	6.3	1.5	0.5
C <sub>20:0</sub>	0.5	–	0.3	0.7	0.4	0.5	0.5	0.2	0.3
C <sub>20:1</sub>	0.4	–	3.2	–	–	4.6	–	–	–
C <sub>20:2</sub>	–	–	0.4	0.3	–	–	0.3	–	–
C <sub>20:3</sub>	–	–	0.3	–	–	0.2	–	–	0.4
C <sub>20:4</sub>	–	–	0.6	–	0.4	1.1	–	–	0.3
C <sub>22:0</sub>	0.9	–	0.5	0.8	–	0.3	0.7	–	–
C <sub>22:1</sub>	–	–	0.4	–	–	0.9	–	–	0.3
Desaturation degree	0.98	1.17	0.99	1.39	1.59	1.18	1.31	1.20	1.01

<sup>a</sup> Sampling time of Phase I, Phase II and Phase III were 72, 96, and 120 h, respectively

<sup>b</sup> All value mean the relative content of fatty acids, % of lipid fraction

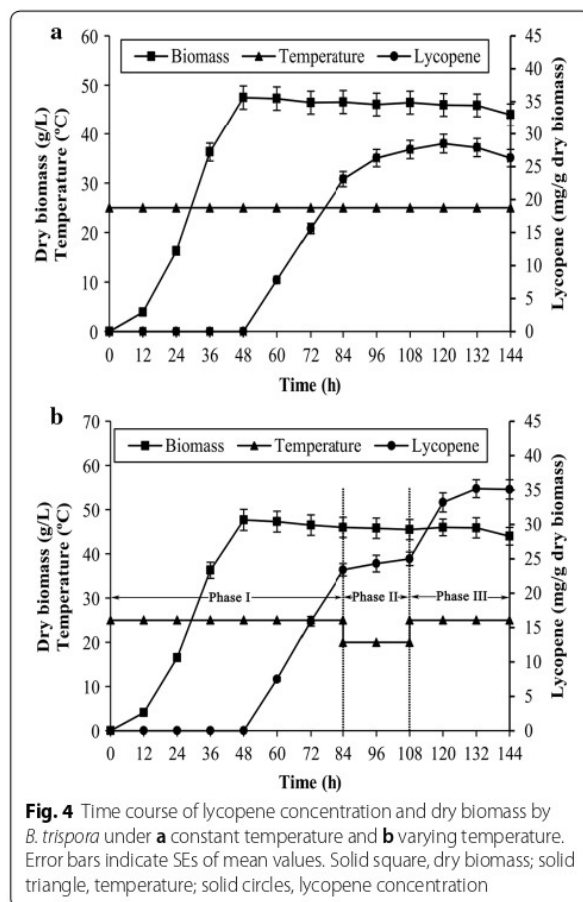


**Fig. 2** Solubility of lycopene in different plant oils. Error bars indicate SEs of mean values



**Fig. 3** Effect of different culture temperature on dry biomass by *B. trispora*. Error bars indicate SEs of mean values

obviously restricted when the culture temperature was below 20 °C. Hence, the cold stress temperature was chosen as 20 °C. The time courses of dry biomass and lycopene production under a suitable growth temperature are shown in Fig. 4a. The biomass increased rapidly at 12 h, reached the maximum value at 48 h, and remained almost constant afterwards. Lycopene production increased rapidly after adding cyclase inhibitor at 48 h and increased slowly after 84 h. Figure 4b shows the changes of the dry biomass and lycopene production with fermentation time under temperature variation. From Fig. 4a, the time of culture temperature adjustment to 20 °C ranged from 84 to 108 h. The change in biomass under this variation was similar to that under constant temperature. Although lycopene concentration increased slightly under cold stress, it increased rapidly when the culture temperature was set to 25 °C again. The final lycopene concentration reached  $35.2 \pm 1.1$  mg/g dry biomass under varying culture temperatures, which was 24% higher than that under constant temperature. The optimum temperature for lycopene production is not 20 °C, since the lycopene concentration remained almost constant at this temperature.



**Fig. 4** Time course of lycopene concentration and dry biomass by *B. trispora* under **a** constant temperature and **b** varying temperature. Error bars indicate SEs of mean values. Solid square, dry biomass; solid triangle, temperature; solid circles, lycopene concentration

**Changes in fatty acid composition in cellular lipids under temperature variation**

The fermentation process was segmented into three phases based on temperature change. The fatty acid compositions of NL, PL, and GL during these three phases are shown in Table 3. When fermentation was carried out to phase two, the fatty acid composition exhibited

**Table 3** Effect of plant oils on the composition and content of intracellular lipid and NADPH concentration by *B. trispora*

	Lipid fractions, % of total lipids			Total content of lipids, % of dry biomass	NADPH (nmol/mg protein)
	NL	PL	GL		
Control	80.4	15.0	4.6	15.3 ± 0.6	0.42 ± 0.01
Soybean oil	92.5	5.6	1.9	45.3 ± 2.1	1.1 ± 0.01
Olive oil	92.5	5.8	1.7	43.1 ± 2.3	0.93 ± 0.02
Linseed oil	89.0	8.5	2.5	31.2 ± 1.4	1.02 ± 0.01

Data of absolute content are expressed as the mean ± SD from three replications

considerable changes due to the influence of the hypothermic conditions. The main modulations involved the increase of unsaturated oleic and linoleic fatty acids against the background of the decrease in saturated stearic and palmitic fatty acids. During phase three, the fatty acid composition of PL and GL almost returned to that in phase one. Surprisingly, the fatty acid composition of NL remained similar to that in phase two; i.e., NL contained high contents of unsaturated oleic and linoleic fatty acids, although culture temperature was recovered. Hence, the desaturated degree of fatty acids of NL increased and persisted until phase three.

### Discussion

Exogenous plant oils are hydrolyzed to fatty acids and glycerol by fungal exolipases. Fatty acids can (a) be oxidized to acetyl-CoA by  $\beta$ -oxidation and (b) be incorporated into reserve lipid structures, such as lipid bodies (Čertík et al. 1997). Acetyl-CoA not only provides energy for metabolism through the tricarboxylic acid cycle but also serves as a common precursor of carotenoids and lipids. Consequently, the increase of precursor stimulates the formation of downstream products. Lycopene is a highly unsaturated hydrocarbon that contains 11 conjugated and two unconjugated double bonds (Shi and Maguer 2000). The desaturation degree of lycopene is much higher than that of intracellular lipids or plant oils. Thus, the increase in the desaturation degree of intracellular lipids was favorable for the dissolution of lycopene. The direct incorporation of exogenous fatty acids, especially linoleic and linolenic acids, enhances the desaturation degree of the fatty acids of the acylglycerols, thus increasing the solubility of lycopene (Mantzouridou and Tsimidou 2007). Therefore, this promotes the storage of large amounts of lycopene in the lipid bodies, which mainly consist of acylglycerols (Danilova and Tereshina 2019; Walther and Farese Jr 2012). NADPH is an essential cofactor in both the elongation and desaturation of the carbon chain of lycopene. One mole of produced lycopene requires 16 mol of NADPH and 24 mol of ATP (data not shown). In oil-enriched substrates, intracellular energy is excessive, resulting from the catabolism of fatty acid-based substrates. Hence, more glucose is metabolized through the HMP pathway, thereby increasing the production of NADPH (Reshamwala and Modi 1985). This, together with the reduced demand for NADPH, ATP and carbon in fatty acid biosynthesis due to the direct incorporation of extracellular unsaturated aliphatic chains, results in the enhanced supply of NADPH, ATP and carbon for carotenoid synthesis.

Among the NL, PL, and GL, the fatty acids of the NL showed the most significant changes in response to

different oils. In contrast, the fatty acids that prevailed in the oils were not significantly accumulated in the PL and GL of the mycelium. The GL acts as a recognition site for specific chemicals as well as helps to maintain the stability of the membrane (Schnaar 2004). PL is the major component of the cell membrane and can provide membrane fluidity and mechanical strength (Bloom et al. 1991). Owing to these special functions, the fatty acid components of the GL and PL were steady. NL has a role in energy and lipophilic substance storage (Athenstaedt 2010). Its content is large and variable. The highest fatty acid components of soybean, olive, and linseed oils are linoleic ( $C_{18:2}$ ), oleic ( $C_{18:1}$ ), and linolenic ( $C_{18:3}$ ) fatty acid, respectively. These acids significantly accumulated in the NL of the mycelium owing to the addition of these three oils. The desaturation degree of fatty acids of NL decreased slightly, although the absolute content of unsaturated oleic acid increased with olive oil addition. This is because the relative contents of linoleic, linolenic and other unsaturated acids decreased with the increase in the absolute content of oleic acid. Calculation of the desaturation degree was based on the relative contents of these fatty acids. The uptake of oils can not only enhance the content of NL of the mycelium but also increase the desaturation degree of fatty acids of the NL (Mantzouridou and Tsimidou 2007). Therefore, more lycopene can be deposited in storage lipid thus reducing the feedback inhibition of free lycopene. Among these oils, soybean oil exhibited the best stimulating effect on lycopene production. In addition to the above mechanism, soybean oil contains high levels of lecithin, a very effective emulsifier of lycopene that can facilitate its transfer from one enzyme to the next.

Lycopene is a secondary metabolite and not necessary for growth in *B. trispora*. Microbes reduce or even suspend unimportant secondary metabolism to maintain basic functions under cold stress (Feofilova 2003). Energy and building material used for lycopene biosynthesis may be reduced under cold stress, resulting in the deceleration of lycopene biosynthesis (phase II in Fig. 4b). But lycopene concentration increased rapidly after returning to normal culture temperature as expected (phase III). The reason for this phenomenon may be the change of lycopene solubility depending on the alteration of fatty acid composition in the reserve lipids. Hence, the changes in fatty acid composition in cellular lipids at varying temperatures were investigated. Microbes respond to temperature stress by changing the composition of the membrane and reserve lipids (Beney and Gervais 2001; Zhu et al. 2007). The changes that occur in lipid acyl chains mainly include saturation and desaturation, isomerization, and changes in the length of fatty acid carbon

chains (Suutari and Laakso 1994; Wagenen et al. 2012). The data obtained enabled us to hypothesize that the changes in the fatty acid composition of NL are difficult to recover, for a time at least. The enhancement of lycopene under cold stress can be mainly attributed to the increase of the desaturation degree of NL. Combined with the influence of plant oils on lycopene production and the fatty acid composition of intracellular lipids, it can be concluded that the increase in the desaturation degree of intracellular lipids benefits the accumulation of lycopene in *B. trispora*.

The oils with fatty acid compositions similar to that of the fungus had more advantages in altering intracellular fatty acid composition and enhancing lycopene production relative to other oils. To our knowledge, this is the first study on the effect of cold acclimation on lycopene biosynthesis by *B. trispora*. Lycopene production were substantially improved just changing fermentation temperature, which may bring some commercial interests. In addition to cold acclimation, other conditions, such as oxygen concentration and pH, can also affect fatty acid composition and lipid content. Therefore, these conditions could be experimentally determined to enhance lycopene production in future studies.

#### Abbreviations

HMP: hexose monophosphate pathway; NL: neutral lipids; PL: phospholipids; GL: glycolipids; FAMES: fatty acid methyl esters; HPLC: high-performance liquid chromatograph.

#### Acknowledgements

Not applicable.

#### Authors' contributions

FL, WQ and YX designed the entire research project. FL carried out the experiments, analyzed and interpreted the data, and drafted the article. FK reviewed the article and checked the writing in English. All authors read and approved the final manuscript.

#### Funding

This work was supported by the Training Program of the National Natural Science Foundation of China [Grant Number 5101049170806].

#### Availability of data and materials

Not applicable.

#### Ethics approval and consent to participate

Not applicable as this article does not contain any studies with human participants or animals by any of the authors.

#### Consent for publication

Not applicable.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Author details

<sup>1</sup> College of Life Sciences, Henan Normal University, Xixiang 453007, China.

<sup>2</sup> The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, and School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China.

Received: 6 June 2019 Accepted: 1 October 2019

Published online: 11 October 2019

#### References

- Athenstaedt K (2010) Neutral lipids in yeast: synthesis, storage and degradation. *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*, pp 471–480
- Authority EFS (2005) Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from the commission related to an application on the use of  $\alpha$ -tocopherol-containing oil suspension of lycopene from *Blakeslea trispora* as a novel food ingredient. *EFSA J* 2(12):1–29
- Benevise L, Gervais P (2001) Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. *Appl Microbiol Biotechnol* 57(1–2):34–42
- Beyer P, Nieveelstein V, Albabili S, Bonk M, Kleinig H (1994) Biochemical aspects of carotene desaturation and cyclization in chromoplast membranes from *Narcissus pseudonarcissus*. *Pure Appl Chem* 66(5):1047–1056
- Bhosale P (2004) Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 63(4):351–361. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1441-1>
- Bloom M, Evans E, Mouritsen OG (1991) Physical properties of the fluid lipid-bilayer component of cell membranes: a perspective. *Q Rev Biophys* 24(3):293–397
- Čertik M, Balteszov L, Šajbidor J (1997) Lipid formation and  $\gamma$ -linolenic acid production by *Mucorales* fungi grown on sunflower oil. *Lett Appl Microbiol* 25(2):101–105
- Cossins A (1994) Homeoviscous adaptation of biological membranes and its functional significance. *Temperature adaptation of biological membranes*. Portland Press, London, pp 63–76
- Danilova OA, Tereshina VM (2019) Effect of trisporoids on lipogenesis of the T(–) strain of a mycelial fungus *Blakeslea trispora*. *Microbiology* 88(1):118–119. <https://doi.org/10.1134/s0026261719010028>
- Dyer JM, Chapal DC, Cary JW, Pepperman AB (2001) Chilling-sensitive, post-transcriptional regulation of a plant fatty acid desaturase expressed in *Yeast*. *Biochem Biophys Res Commun* 282(4):1019–1025. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4667>
- Feofilova E (2003) Deceleration of vital activity as a universal biochemical mechanism ensuring adaptation of microorganisms to stress factors: a review. *Appl Biochem Microbiol* 39(1):1–18
- Feofilova E, Tereshina V, Memorskaya A, Khokhlova N (2000) Different mechanisms of the biochemical adaptation of mycelial fungi to temperature stress: changes in the lipid composition. *Microbiology* 69(5):509–515
- Feofilova E, Tereshina V, Memorskaya A (2005) Biochemical mechanisms of temperature adaptation in the (+) and (–) strains of *Blakeslea trispora*. *Microbiology* 74(6):650–654
- Feofilova EP, Tereshina VM, Memorskaya AS, Dul'kin LM, Goncharov NG (2006) Fungal lycopene: the biotechnology of its production and prospects for its application in medicine. *Microbiol Immunol* 75(6):629–633
- Garba L, Ali MSM, Oslan SN, Rahman RNZRBA (2017) Review on fatty acid desaturases and their roles in temperature acclimatization. *J Appl Sci* 17(6):282–295
- Gargano S, Dilallo G, Kobayashi GS, Maresca B (1995) A temperature-sensitive strain of *Histoplasma capsulatum* has an altered  $\Delta 9$ -fatty acid desaturase gene acid desaturase gene. *Lipids* 30(10):899–906
- Hoppe PP, Krämer K, Berg HVD, Steenge G, Vliet TV (2003) Synthetic and tomato-based lycopene have identical bioavailability in humans. *Eur J Nutr* 42(5):272–278
- Khachik F, Carvalho L, Bernstein PS, Muir GJ, Zhao DY, Katz NB (2002) Chemistry, distribution, and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health. *Exp Biol Med* 227(10):845
- Lepage G, Roy CC (1984) Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *J Lipid Res* 25(12):1391–1396
- López-Nieto MJ, Costa J, Peiro E, Méndez E, Rodríguez-Sáiz M, Fuente JLDL, Cabri W, Barredo JL (2004) Biotechnological lycopene production by mated fermentation of *Blakeslea trispora*. *Appl Microbiol Biotechnol* 66(2):153–159
- Mantzouridou FT, Naziri E (2017) Scale translation from shaken to diffused bubble aerated systems for lycopene production by *Blakeslea*

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

- (21), (22) Заявка: 2004119099/13, 24.06.2004
- (24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
24.06.2004
- (45) Опубликовано: 27.02.2006 Бюл. № 6
- (56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: EA 003212 B1, 27.02.2003. EA 002468 B1, 25.04.2002. RU 2211862 C2, 10.09.2003. RU 2102416 C1, 20.01.1998. RU 2126806 C1, 27.02.1999.

Адрес для переписки:  
117593, Москва, Литовский б-р, 3, корп.2,  
кв.543, М.И.Авчиеву

- (72) Автор(ы):  
Авчиева Пенкер Бабаевна (RU),  
Буторова Ирина Анатольевна (RU),  
Авчиев Марат Исламутдинович (RU),  
Деев Сергей Вячеславович (RU),  
Зорина Любовь Васильевна (RU)
- (73) Патентообладатель(и):  
Общество с ограниченной ответственностью  
"Биосинтез Мт" (RU)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИКОПИНА, ФОСФОЛИПИДОВ, ЖИРНЫХ КИСЛОТ И ЭРГОСТЕРИНА ПУТЕМ СОВМЕСТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ (+) И (-) ШТАММОВ ГРИБА *Blakeslea trispora*

## (57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии и касается производства витаминов и антиоксидантов, в частности производства ликопина, фосфолипидов, жирных кислот и эргостерина. Сущность изобретения заключается в том, что при совместном глубинном культивировании пары гриба *Blakeslea trispora* Б-1(-) и Б-2(+) на минеральной среде с глюкозой через 26 часов культивирования накапливается до 40 мг/г АСВ ликопина, на среде с гидролом и кукурузным экстрактом через 30 часов от начала культивирования - до 50 мг/г АСВ ликопина. Для получения биологически активных соединений (ликопина, эргостерина, фосфолипидов и жирных кислот) биомассу отделяют от культуральной жидкости и высушивают. Экстракцию липидов из

биомассы проводят гидрофобным растворителем. Отделяют полученный экстракт от биошрота путем его горячей фильтрации. Кристаллизацию ликопина ведут в среде того же органического растворителя, что и процесс экстракции. Кристаллы ликопина отделяют фильтрованием. Выход кристаллического ликопина в результате проведения способа составляет 70-72% от содержания его в биомассе. После отделения кристаллов ликопина последовательно осуществляют следующие стадии: выделения и очистки фосфолипидов; выделения и очистки жирных кислот; выделения и очистки эргостерина. Преимуществом изобретения является повышение выходов целевых продуктов, а также упрощение и удешевление процесса экстракции. 1 табл.

RU 2 2 7 0 8 6 8 C 1

RU 2 2 7 0 8 6 8 C 1

Изобретение относится к области биотехнологии и касается производства витаминов и антиоксидантов, в частности производства ликопина, эргостерина, фосфолипидов, жирных кислот.

5 В настоящее время установлено, что биологически активные соединения, такие как ликопин, эргостерин, фосфолипиды, жирные кислоты и др., успешно используются для

лечения и профилактики различных заболеваний.  
Ликопин относится к классу природных соединений - каротиноидам. Это пигмент, который придает здоровую красную окраску фруктам и овощам, таким как помидоры, арбузы, розовые грейпфруты, облепиха и др. Исследования последних лет  
10 свидетельствуют о том, что ликопин наряду с красящей функцией имеет самостоятельное значение как биологически активная добавка. Ликопин оказывает общеукрепляющее действие на организм и обладает большим набором ценных фармакологических свойств. Подавляя в организме свободнорадикальное окисление, ликопин стабилизирует иммунный статус организма, улучшает протекание ряда важнейших биологических процессов в  
15 организме, в том числе нормализует уровень глюкозы в крови, липидный обмен, зрение и контролирует пролиферацию (новообразование) клеток. Была установлена высокая эффективность использования ликопина при лечении заболеваний предстательной железы, легких, желудка, катаракты, ишемической болезни сердца, атеросклероза [1-3]. Биологическая активность ликопина связана, прежде всего, с его антиоксидантными  
20 свойствами, т.е. способностью ингибировать свободнорадикальные процессы в клетках. При этом было показано, что ликопин обладает более выраженной способностью устранять вредное воздействие синглетного кислорода по сравнению с  $\beta$ -каротином [4].

Эргостерин - предшественник витамина  $D_2$ , который получается при облучении эргостерина ультрафиолетовыми лучами.  $D_2$  играет важную роль в обеспечении организма  
25 кальцием, прежде всего за счет правильного использования кальция, поступающего с пищей. При недостатке витамина  $D_2$  в организме происходит нарушение минерализации в процессе костеобразования, что приводит к серьезным изменениям в костном скелете.

Любые заболевания печени независимо от этиологии (действие алкоголя, лекарственных препаратов, промышленных и бытовых токсинов, неправильного питания,  
30 вирусных инфекций и т.д.) вызывают повреждение мембран клеток с потерей фосфолипидов, которые являются основными структурными компонентами мембран. Потеря собственных фосфолипидов приводит сначала к инактивации, а затем и к гибели клеток печени. Фосфатидилхолин (лецитин), входящий в состав фосфолипидов, является основным структурным компонентом всех клеточных мембран. При пероральном введении  
35 в организм фосфатидилхолин восстанавливает целостность мембран клеток, в первую очередь печени. Фосфатидилхолины используют во многих отраслях промышленности благодаря их прекрасным диспергирующим и эмульгирующим свойствам.

Жирные кислоты имеют широкий спектр применения в парфюмерии, фармакологии, медицине. Наиболее ценными являются полиненасыщенные жирные кислоты. Они должны  
40 поступать в организм человека с пищей. При их недостаточности наблюдается отставание в росте, развиваются характерные поражения со стороны кожи и волосяного покрова.

Известны многочисленные способы получения отдельных биологически активных соединений, в частности ликопина, эргостерина, фосфолипидов, жирных кислот с использованием различных микроорганизмов - продуцентов.

45 Известен способ получения эргостерина из дрожжей (Авт. свид. СССР №465812) [5]. Описан штамм микроскопического гриба *Neurospora rosellus*, который используется для получения липидов с высокой степенью ненасыщенности жирных кислот (патент РФ №2020155) [6]. Известен штамм *Streptomyces chrostomyceticus*, который на минеральной среде накапливает 20-50 мг/кг ликопина (патент Италии №343773) [7]. Описан штамм  
50 бактерий *Mycobacterium tuberculosis*, который на среде с мелассой и кукурузным экстрактом накапливает до 7,05 мг/г суммарных каротиноидов. При этом в пигментном комплексе бактерий помимо ликопина обнаружены  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ -каротин, ауроксантин, лютеин, криптоксантин, виолоксантин, зеаксантин, антраксантин, рубиксантин, лепротеин,

неоксантин (А.с. СССР №1071636) [8].

Наиболее активными продуцентами ликопина являются грибы *Phycomyces blakesleanus* и *Blakeslea trispora*. У гриба *Phycomyces blakesleanus* в зависимости от особенностей штамма и условий культивирования уровень накопления ликопина колеблется в интервале 192-600 мкг/г АСВ [9].

Известны способы получения ликопина из биомассы гриба *Blakeslea trispora* [10-12]. В соответствии с описанными способами выход кристаллического ликопина составляет 31-56% от количества его в биомассе.

Согласно изобретению, описанному в патенте РФ №2102416, выращивают штаммы гриба *Blakeslea trispora* А-732-3 (+) и А-731-3 (-) или 8А (+) и 8А (-) на кукурузно-соевой среде с добавлением в качестве стимуляторов ликопинообразования соединений класса аминотилпиридинов или табачной крошки. Выращивание (+) и (-) штаммов ведут в течение 48 часов, полученный посевной материал используют в соотношении 1:9 для последующей ферментации. Получение целевого продукта осуществляют экстракцией подсолнечным маслом, кристаллизацией с использованием этанола и толуола и последующей колоночной хроматографией в системе н-гексан - ацетон 50:1.

В соответствии с описанным способом выход ликопина составляет 0,7 г/л среды. Соотношение ликопина и β-каротина составляет 11:1 или 92% и 8% соответственно. К сожалению, в патенте не указан уровень накопления биомассы гриба в единице объема питательной среды, что не дает возможность оценить ликопинсинтезирующую активность культуры - продуцента. Кроме того, для накопления ликопина культурой гриба *Blakeslea trispora* указанными штаммами в среду добавляют стимуляторы: аминотилпиридин или табачную крошку. При этом табачная крошка является более слабым стимулятором в сравнении с аминотилпиридином, так при ее добавлении в среду культивирования уровень накопления ликопина грибом *Blakeslea trispora* составляет 0,4 г/л, что в 1,7 раза ниже по сравнению с аминотилпиридином. Добавление в среду культивирования производных пиридина несмотря на их низкие концентрации (0,01-0,005%) нежелательно.

Во всех вышеперечисленных способах получения биологически активных соединений используется, как правило, один конкретный штамм микроорганизма - продуцента того или иного вида соединения.

Наиболее близкими к заявленному изобретению по технической сущности и достигаемому результату является способ получения ликопина, описанный в Евразийском патенте №002468 [13] и способ получения антиоксидантов и биологически активных соединений липидной природы, описанный в Евразийском патенте №003212 [14]. Согласно изобретению [13] ликопин получают при совместном выращивании штаммов гетероталлического гриба *Blakeslea trispora* ВСБ-129(-) ВСБ-130(+). Выращивание ведут по 2-стадийной схеме культивирования на минеральной среде с глюкозой или кукурузно-соевой среде.

На минеральной среде с глюкозой на 1-ой стадии выращивают (-) штамм гриба в течение 20 часов, затем на 2-ой стадии в среду культивирования добавляют 3% глюкозы и (+) штамм гриба. Совместное выращивание (+) и (-) штаммов ведут в течение 36 часов. При этом в биомассе накапливается до 35 мг ликопина в пересчете на 1 г абсолютно сухого веса (АСВ) биомассы.

На кукурузно-соевой среде на 1-ой стадии выращивают (-) штамм в течение 32 часов, далее, на 2-ой стадии в среду культивирования вносят (+) штамм гриба. Совместное выращивание ведут в течение 48 часов. При этом в биомассе накапливается до 30 мг ликопина в расчете на 1 г абсолютно сухого веса (АСВ) биомассы.

Экстракцию из биомассы гриба проводят смесью растворителей этанол : гексан в соотношении 4:1 в 3 ступени при температуре 60°C в течение 30 минут на каждую ступень. Соотношение биомассы и растворителя 1:5. Кристаллизацию ликопина ведут в этиловом спирте при температуре 5°C в течение 20 часов. При этом выход ликопина составляет 55% от содержания его в биомассе. Доля основного вещества - 90%.

Согласно изобретению [14] биологически активные соединения липидной природы из

биомассы гриба *Blakeslea trispora* получают экстракцией полярным растворителем (например, ацетоном или этанолом) или смесью полярного и неполярного растворителей (например, ацетон : гексан или этанол : гексан) при температуре 40-70°C в три ступени при соотношении биомасса : экстрагент, равном 1:3,5 на первой ступени, до 1:1,5 на 5 последней. Отделяют полученный экстракт от биошрота путем его горячей фильтрации при 50-60°C. После чего экстракт ставят на кристаллизацию каротиноидов в смеси полярного и неполярного растворителей при 5-20°C в течение 3-24 часов при слабом перемешивании. Выпавшие кристаллы каротиноидов отделяют фильтрованием и промывают этанолом. 10 После отделения кристаллов каротиноидов из раствора липидов выделяют фосфолипиды при температуре 5-20°C в течение 1-5 часов при слабом перемешивании. Кристаллизацию фосфолипидов проводят в ацетоне или смеси ацетона и неполярного растворителя (например, гексана). Полученные фосфолипиды направляются на дальнейшее фракционное разделение в растворе этанола с целью выделения фракции лецитина. 15 Полученный раствор нейтральных липидов омыляют в среде ацетона в водном растворе гидроксида калия при 50-70°C в течение 20-60 минут. Затем омыленную фракцию разбавляют водой и гидролизуют серной кислотой для получения смеси жирных кислот. Неомыленную фракцию упаривают, перерастворяют в гексане и кристаллизуют эргостерин при 0-20°C в течение 4 часов при соотношении гексан : неомыляемая фракция, равном 1:3- 1:50, а затем отфильтровывают полученный в процессе кристаллизации эргостерин. 20 Эргостерин на фильтре промывают органическим растворителем или проводят, при необходимости, повторную кристаллизацию. Далее эргостерин счищают с фильтра и высушивают при 60°C.

Задачей данного изобретения является получение новых высокоэффективных 25 штаммов - продуцентов биологически активных соединений, в частности ликопина, эргостерина, фосфолипидов, жирных кислот, разработка более эффективного способа их получения, расширение числа продуцентов, упрощение и удешевление процесса экстракции.

Сущность предлагаемого изобретения заключается в том, что в результате 30 многоступенчатой селекции и отбора получена пара гриба *Blakeslea trispora* Б-1(-) и Б-2(+), которая при совместном глубинном культивировании на минеральной среде с глюкозой через 26 часов культивирования накапливает до 40 мг/г АСВ ликопина, на среде с гидролом и кукурузным экстрактом (отходами крахмалопаточного производства) через 30 часов от начала культивирования - до 50 мг/г АСВ ликопина. Содержание ликопина 35 составляет 92-96% от суммы каротиноидов.

Штаммы гриба Б-1(-) и Б-2(+) получены из штаммов гриба *Blakeslea trispora* ВКПМ F - 414 (-) и ВКПМ F - 414 (+) в результате многоступенчатой селекции с последовательным применением ультрафиолетовых лучей, N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидина и 40 дифениламина в качестве мутагенных факторов и рассевом на чашки Петри с питательной средой сусло-агар (7°Б). Через 18-24 часа выращивания изолированные колонии отсеивали в пробирки на скошенный сусло-агар. Отбор колонии производили после 8-10 дневного выращивания их в пробирках при 26°C по признаку наибольшего пигментообразования с последующим определением продуктивности выделенных вариантов. Штаммы Б-1 и Б-2 имеют следующие морфологические характеристики:

45 Сусло-агар. Штамм Б-2(+) форма. Рост штамма интенсивный. Воздушный мицелий развит слабо. Субстратный мицелий хорошо развит, плотный, желтовато-бежевого цвета. Спорообразование слабое.

Штамм Б-1(-) форма. Рост менее активный по сравнению со штаммом Б-2. Воздушный мицелий отсутствует. Спорообразования на данной среде не обнаруживаются. 50 Субстратный мицелий штамма красновато-оранжевого цвета.

При совместном росте на среде сусло-агар в месте соприкосновения (+) и (-) штаммов не образуется характерной полосы черных зигоспор. После соприкосновения с (+) штаммом вся поверхность мицелия (-) штамма окрашивается в бордово-красный цвет.

Штаммы хранятся в коллекции компании ООО «Биосинтез-Мт», авторами штаммов является коллектив авторов Авчиева П.Б., Буторова И.А. и др.

Для получения биомассы с наивысшим содержанием жирорастворимых биологически активных соединений - ликопина, фосфолипидов, жирных кислот и эргостерина процесс культивирования штаммов *Blakeslea trispora* Б-1(-) и Б-2(+) проводят на специально подобранных питательных средах и режимах выращивания. Питательная среда должна содержать в своем составе легкодоступные источники углерода и азота, а также микроэлементы.

Подготовку посевного материала осуществляют путем отдельного выращивания Б-1(-) и Б-2(+) форм на косяках с сусло-агаром в течение 10 суток при температуре 26-28°C. Далее штаммы отдельно засевают в качалочные колбы со стерильными средами, содержащими в своем составе кукурузную и соевую муку в количестве 1-10% каждого компонента,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  от 0,01 до 1,00%, тиаминхлорида -  $2 \times 10^{-5}$ - $2 \times 10^{-4}$ %, оптимальным значением pH для роста культур является pH 6,0-8,0. На данной среде (-) штамм гриба *Blakeslea trispora* Б-1 выращивают в течение 60-92 часов при температуре 26-28°C, при оборотах качалки 150-250 об/мин. (+) Штамм гриба выращивают при тех же условиях, но в течение 36-72 часов. Полученная в результате отдельного культивирования биомасса используется в дальнейшем для совместной ферментации Б-2(+) и Б-1(-) штаммов гриба *Blakeslea trispora*. Совместную ферментацию проводят в стерильных условиях на минеральной среде, содержащей легко доступные источники углерода и азота, а также микроэлементы, или на средах, содержащих отходы крахмалопаточного производства (гидрола и кукурузного экстракта), при тех же значениях pH, температуры и оборотах качалки, причем сначала в среду культивирования вносят (-) штамм гриба и только после 12-36 часов от начала культивирования вносят (+) штамм в количестве 0,1-20% (объем.) от первоначально внесенного объема (-) штамма. Совместное культивирование (+) и (-) форм ведут в течение 24-72 часов.

Способы получения биомассы гриба *Blakeslea trispora*, содержащей в своем составе ликопин, фосфолипиды, жирные кислоты и эргостерин, иллюстрируются в примерах 1 и 2.

Для получения биологически активных соединений (ликопина, эргостерина, фосфолипидов, жирных кислот) биомассу совместно выращенных (+) и (-) штаммов отделяют от культуральной жидкости и высушивают. Экстракцию липидов из биомассы (влажностью 10-15%) проводят любым гидрофобным растворителем при температуре 40-65°C в несколько ступеней при соотношении биомасса : экстрагент от 1:1 до 1:20 (мас.). Наиболее подходящими экстрагентами являются: нефрас, гексан, четыреххлористый углерод, хлороформ. Полученный экстракт отделяют от биожирот путем его горячей фильтрации при 50-60°C.

Кристаллизацию ликопина ведут при 5-20°C в течение 3-24 часов при слабом перемешивании в среде того же органического растворителя, что и процесс экстракции. Данное техническое решение позволяет использовать на первых двух стадиях технологического процесса один и тот же органический растворитель, что приводит к упрощению аппаратного оформления и снижению затрат на производство целевых продуктов. Выпавшие кристаллы ликопина отделяют фильтрованием. Выход кристаллического ликопина с чистотой 92-96% в результате проведения предлагаемого процесса составляет 70-72% от содержания этого каротиноида в биомассе. После отделения кристаллов ликопина последовательно осуществляют следующие стадии:

- выделение и очистка фосфолипидов;
- выделение и очистка жирных кислот;
- выделение и очистка эргостерина.

Выделение и очистку указанных выше веществ осуществляют методами, предложенными нами ранее [15, 16], которые проиллюстрированы примерами 3 и 4.

Пример 1.

Подготовка посевного материала:

Штаммы гриба *Blakeslea trispora* Б-1 и Б-2 выращивают на косяках сусло-агар в

течение 10 суток. Далее штаммы засевают в качалочные колбы на кукурузно-соевой среде следующего состава:

5	Соевая мука	- 4,5%
	Кукурузная мука	- 2,3%
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	- 0,05%
	Тиаминхлорид	- 2×10 <sup>-4</sup> %
	pH среды	- 6,8

Выращивание (-) штамма ведут при 26-27°C на качалке при 200 об/мин в течение 72 часов, (+) штамм выращивают в течение 48 часов. Выросшую культуру гриба Б-1(-) использовали как засевной материал для основной ферментации.

Ферментацию ведут на минеральной среде с глюкозой следующего состава:

15	Глюкоза	- 20 г/л
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	- 9,0 г/л
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	- 5,8 г/л
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	- 2,5 г/л
	MgSO <sub>4</sub>	- 0,34 г/л
	Пептон	- 20 г/л
20	Тиаминхлорид	- 2×10 <sup>-4</sup> %
	pH среды	- 6,8

На минеральной среде (-) штамм гриба *Blakeslea trispora* Б-1 выращивают 18 часов при 27-28°C. Затем в среду культивирования добавляют предварительно выращенный на кукурузно-соевой среде в течение 48 часов (+) штамм гриба в количестве 1% от объема среды и далее ведут совместное выращивание штаммов в течение 28 часов. Через 26 часов от начала совместного выращивания в биомассе накапливается 40 мг ликопина в расчете на 1 грамм абсолютно сухой биомассы.

Пример 2.

То же, что и в примере 1, но для основной ферментации используют среду на основе отходов крахмалопаточного производства (гидрола и кукурузного экстракта) следующего состава:

35	гидрол	- 6,5 г/л
	кукурузный экстракт	- 81 г/л
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	- 4,1 г/л
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	- 1,28 г/л
	pH среды	- 6,8

На данной среде (-) штамм гриба *Blakeslea trispora* Б-1 выращивают 20 часов при 27-28°C. Затем в среду культивирования добавляют предварительно выращенный на кукурузно-соевой среде в течение 48 часов (+) штамм гриба в количестве 1% от объема среды и далее ведут совместное выращивание штаммов в течение 30 часов. Через 30 часов от начала совместного выращивания в биомассе накапливается 50 мг ликопина в расчете на 1 грамм абсолютно сухой биомассы.

Пример 3.

Биомассу гриба *Blakeslea trispora* в количестве 110 г (влажность 10,0%) экстрагируют в три ступени гексаном (соотношение биомасса : экстрагент - 1:6) при 60,0°C. Затем полученные экстракты объединяют. В результате получают 29,7 грамм липидов, имеющих представленный фракционный состав (см. табл.1).

50	Таблица 1. Фракционный состав липидов гриба <i>Blakeslea trispora</i> (экстрагент гексан).*	
	Компоненты	Содержание в % от суммы липидов
	Фосфолипиды	28,8
	Моноглицериды	4,0
	Диглицериды	4,0

Эргостерин	4,7
Свободные жирные кислоты	23,2
Триглицериды	18,4
Ликопин	11,7
Углеводороды	5,2

\*состав представлен на липиды, очищенные от органического растворителя.

5

Раствор липидов в гексане охлаждают до +5°C и выдерживают в течение 3 часов при слабом перемешивании, выпавшие кристаллы ликопина отфильтровывают. Полученный ликопин в количестве 2,9 г промывают этиловым спиртом, в результате получают кристаллы с содержанием основного вещества не менее 92-96%. После отделения ликопина из раствора липидов выделяют фосфолипиды при -5°C, для чего к раствору липидов приливают трехкратный объем ацетона. Кристаллизуют фосфолипиды в течение 2,5 часов. В результате процесса получают 6,1 г фосфолипидов. Раствор липидов в ацетоне упаривают, а затем перерастворяют в этаноле и омыляют в 25% водном растворе гидроксида калия при 50°C в течение 20 минут. Омыленную фракцию разбавляют 200 мл воды и гидролизуют H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Полученные жирные кислоты экстрагируют гексаном, в результате получают 4,8 грамм смеси жирных кислот. Неомыленную фракцию экстрагируют гексаном в три ступени по 150 мл на каждой, экстракты объединяют, частично упаривают и кристаллизуют эргостерин при 0°C и соотношении гексан : липиды, равном 1:3. Выпавший в осадок эргостерин фильтруют, промывают и сушат при 60°C, в результате получают 0,9 г эргостерина. Содержание основного вещества в образце эргостерина составляет 85,0%.

15

Пример 4.

То же, что и в примере 3, но экстракцию биомассы проводят в среде нефраса (t кип. = 70-80°C) при соотношении биомасса : экстрагент, равном 1:3, при температуре 65°C, в четыре ступени, длительностью 40 минут каждая. При охлаждении объединенных экстрактов на фильтре собирают осадок, содержащий комплексную фракцию фосфолипидов и ликопина в количестве 11,8 г. Полученный осадок является конечным продуктом технологии, поскольку значительное содержание фосфолипидов защищает ликопин от окисления, т.е. увеличивает его срок хранения.

25

Список литературы.

1. Minthy L., Steven J. Shwartz // Lycopene: Chemical and Biological Properties. Foodtechnology, 1999, vol.53, №2, p.33-43.
2. Патент ЕП 00544.
3. American Journal of Epidemiology 1999; 149: 168-176.
4. Macio P.D., Devasagayam T.P.A., Kaiser S., Sies H. // Biochem. Soc. Transactions. - 1990 - v. 18. N6. - p.1055-1056.
5. А.с. СССР №465812.
6. Патент РФ №2020155.
7. Патент Италии №343773.
8. А.с. СССР №1071636.
9. B.J.Mehta. E.Cerda-Olmedo // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 1995. - № 42. - p.836-838.
10. Патент РФ 2112747.
11. Патент РФ №2126806.
12. Патент РФ №2102416.
13. Прототип Евразийский патент №002468.
14. Прототип Евразийский патент №003212.
15. Деев С.В., Буторова И.А., Авчиева П.Б. // Биотехнология. - 2000 - №5 - с.36-40.
16. Деев С.В., Буторова И.А., Авчиева П.Б. // Биотехнология. - 2001 - №4 - С.22-31.

30

#### Формула изобретения

Способ получения биологически активных соединений липидной природы, а именно ликопина, фосфолипидов, жирных кислот и эргостерина, путем совместного культивирования двух штаммов гетероталлического гриба *Blakeslea trispora* на питательной



Article

# Improved Lycopene Production from Different Substrates by Mated Fermentation of *Blakeslea Trispora*

Ayse Sevgili and Osman Erkmen \*

Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, University of Gaziantep, 27310 Gaziantep, Turkey; aysesevgili8@gmail.com

\* Correspondence: erkmen@gantep.edu.tr; Tel.: +90-342-317-2313; Fax: +90-342-317-2362

Received: 23 February 2019; Accepted: 28 March 2019; Published: 9 April 2019



**Abstract:** The production of lycopene from different substrates by *Blakeslea trispora* in fermentation was investigated. Lycopene productions from 4 and 6% glucose (pH 6.5) in shake flask fermentation were 77.7 and 28.1 mg L<sup>-1</sup>. Increasing the glucose concentration to 6% resulted in a decrease in lycopene production by 36.2%. A maximum lycopene concentration of 944.8 mg L<sup>-1</sup> was detected with 4% glucose supplemented with 1.0 % sunflower oil in fermentor studies. Lycopene productions in the presence of sunflower and corn oils in the fermentor were 12.2 and 11.1 times higher, respectively, then without oil from 4 % glucose in a shake flask. Lycopene production from orange peel was two times higher in the fermentor than in the shake flask. Zygosporangia of *B. trispora* are the morphological forms, which are responsible for the production of the lycopene. The highest level of zygosporangia was correlated with the highest amount of intracellular lycopene in the total biomass dry weight. The media containing only orange powder (1%) gave a 4.9 mg L<sup>-1</sup> lycopene production in a fermentor. The biosynthesis of lycopene has been started in most cases simultaneously in the early growth phase even in trace amounts. Maximum lycopene concentration was obtained when the medium was supplied with sunflower and corn oils. There is an indirect relationship between biomass and lycopene concentration.

**Keywords:** lycopene; *Blakeslea trispora*; fermentation; vegetable oil; orange powder

## 1. Introduction

Lycopene is an important naturally occurring intermediate metabolite in the mevalonate metabolic pathway of microorganisms and can be transformed into  $\beta$ -carotene by lycopene cyclase. Thus, in order to enhance lycopene accumulation, lycopene cyclase activity should be inhibited by adding lycopene cyclase inhibitors into the fermentation medium. Lycopene has important physiological functions to prevent chronic diseases, including osteoporosis, certain types of cancer, cataract formation and cardiovascular diseases; enhance immune responses; and other biological effects in humans and animals [1,2]. In the last few years, demand on lycopene has increased due to its use in the food, pharmaceutical, cosmetic and animal feed industries [3]. Moreover, lycopene is used as an antioxidant to reduce cellular or tissue damage, and as a coloring agent for food products [4]. These make lycopene very attractive in the food and feed industries, and in medicine and cosmetic formulation. Lycopene used industrially is manufactured from plant extraction and chemical synthesis. Market needs for lycopene are not met using plant extraction due to the restricted number of plant sources and high cost. Chemical synthesis also has disadvantages including low yields, product instability, low product quality and high production cost. Due to decreased natural production of lycopene and its increased worldwide demand, there is the potential for lycopene to be produced using fermentation. Various

algae and fungi produce intracellular carotenoids, including  $\beta$ -carotene, lycopene and astaxanthin. *Blakeslea trispora*, *Mucor circinelloides*, *Candida utilis* and *Phycomyces blakesleeanus* have the ability to produce lycopene [5]. *B. trispora* has an advantage in that it does not need any specific fermentation conditions for growth. Mating type of (+) and (−) *B. trispora* strains together can increase production of lycopene [6].

There is much interest in biotechnological production of lycopene due to consumer demand for high quality and “natural” food additives. Efforts have been made to increase the lycopene yield and reduce process costs, by using low-cost agro-food media rich in organic compounds (such as carbon, nitrogen, mineral and other sources). The amount of lycopene production depends on microorganism, the culture medium, substrates and the fermentation conditions (temperature, pH, aeration rate etc.). Most of the research has been aimed at optimizing the culture conditions that directly affect the growth of the microorganism. The main research is focused on optimization of the medium, extraction of lycopene from *B. trispora* and fermentation conditions [4–9].

An industrial mold over-producing lycopene is *B. trispora* which accumulates all-trans-carotene, as a secondary metabolite [10]. *B. trispora* is a saprophyte and performs vegetative cycle of spores and filamentous mycelia [6]. There has been a lot of effort to use food wastes in the production of lycopene mitigation [11]. At present, there are no research on the use of orange powder and sunflower oil in the production of lycopene. The transport cost, sales problems, low quality and susceptibility to spoilage of the food-wastes by microorganisms have led to alternative utilization approaches. Agro-food wastes (fruits and vegetables: cabbage residues, watermelon husk and peach powders) have been used in the production of carotenes by *B. trispora* [12,13].

Optimization of fermentation conditions can also be required in the production of lycopene from different nutrient sources. This report was focused on the effect of a series of media containing various substrates (glucose, refined vegetable oils and orange powder) in the accumulation of lycopene in submerged shake flasks and fermentor studies. Morphological, biomass and pH changes occurring during fermentations were also studied.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Microorganism and Chemicals

*Blakeslea trispora* mating strains ATCC 14,271 (+) and ATCC 14,272 (−) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MA, USA). Lyophilized cultures were rehydrated with malt extract broth (MEB; Darmstadt, Germany) by incubation at 35 °C for 3 days and were used in the stock culture preparation. Stock cultures of *B. trispora* were prepared on potato dextrose agar (PDA; Darmstadt, Germany) slant. Yeast extract, glucose, agar, asparagine, starch, lycopene, nicotine,  $\text{KHPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ , HPLC grade petroleum ether, methanol, acetonitrile and dichloromethane were obtained from Sigma-Aldrich (Interlab Company, Adana, Turkey).

### 2.2. Preparation of *B. Trispora* Cultures

*B. trispora* (+) and (−) cultures were prepared for fermentation studies using a yeast phosphate soluble starch (YpSS) agar medium. The composition of YpSS agar medium ( $\text{g L}^{-1}$ ) was: Yeast extract 4.0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.0,  $\text{MgSO}_4$  0.5, starch 15.0 and agar 20.0. The pH of the medium was adjusted to 6.5. Each of the *B. trispora* strains from stock culture was inoculated separately onto YpSS agar plates and incubated at 28 °C for 5 days. After sporulation of cultures, 10 mL of sterile distilled water was added onto the cultures in the Petri plates and the spores were collected by scraping off the medium surface using a sterile cotton swab. The spore suspension containing  $3.9\text{--}8.5 \times 10^6$  spores  $\text{mL}^{-1}$  was used to inoculate the fermentation media. Strains were inoculated into the fermentation medium with 2.5 and 7.5 mL of spore suspension (+) and (−) strains, respectively, to provide 1:3 ratio of inoculation.

### 2.3. Preparation of Fermentation Media

The basal fermentation medium (BFM) had the following composition ( $\text{g L}^{-1}$ ): Yeast extract 1.0, asparagine 2.0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.5 and  $\text{MgSO}_4$  0.5. BFM was supplemented with different concentrations of ingredients as given in Table 1: Refined vegetable oils (sunflower and corn oils), glucose and milled orange peel (powder). Samples of orange (*Citrus sinensis*) peel were dried at  $40^\circ\text{C}$  to reach a final moisture lower than 10%, milled to a particle size ( $250\ \mu\text{m}$ ) using a laboratory grinder (Roller type lab mill RM 1300, Erkaya, Ataşehir, İstanbul, Turkey), homogenized in a single lot to avoid any variation in composition, and stored at  $4^\circ\text{C}$  in a cold chamber until use. Fermentation media were prepared at two different pH: 6.5 and 5.5. Fermentation media (50 mL) in Erlenmeyer flasks (250 mL) were sterilized at  $121^\circ\text{C}$  for 15 min in autoclave. Fermentation media for fermentor studies were sterilized in a 7 L Bioflow 410 sterilizable-in-place benchtop fermentor (New Brunswick Scientific BioFlo 410 SIP Fermentor, Eppendorf, New York, MA, USA).

Table 1. Medium composition.

Medium Number	Composition			
	Glucose ( $\text{g L}^{-1}$ )	Sunflower Oil ( $\text{ml L}^{-1}$ )	Corn Oil ( $\text{ml L}^{-1}$ )	Orange Powder ( $\text{g L}^{-1}$ )
<b>In shake flask studies</b>				
1	40	-	-	-
2	60	-	-	-
3	40	10	-	-
4	40	30	-	-
6	40	-	10	-
7	40	-	30	-
8	-	-	-	10
9	-	-	-	20
<b>In fermentor studies</b>				
10	40 <sup>a,b</sup>	-	-	-
11	60 <sup>a</sup>	-	-	-
12	40 <sup>a</sup>	10	-	-
13	40 <sup>a</sup>	-	10	-
14	-	-	-	10 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> At  $3\ \text{L min}^{-1}$  aeration and 500 rpm agitation. <sup>b</sup> At  $12\ \text{L min}^{-1}$  aeration and 750 rpm agitation.

### 2.4. Shake Flask Fermentation Process

Fermentation media (50 mL) in Erlenmeyer flasks (250 mL) were inoculated with 10 mL *B. trispora* strains ATCC 14,271 (+) and 14,272 (−) by 1:3 ratio from spore stock culture. The lycopene cyclase inhibitor of nicotine (5 mM) was added on the second day of fermentation. Fermentation media (total volume 60 mL) were incubated at  $28^\circ\text{C}$  for 7 days on a bench type water bath shaker ST-402 (NÜVE; Sanayi Malzemeleri Imalat ve Ticaret A. Ş., İstanbul, Turkey) with wrist shaking at 120 rpm.

### 2.5. Fermentation Process in Fermentor

All fermentations were performed in the Bioflow 410 fermentor with a working volume of 5.0 L. Sterilization sequences in this fermentor are fully automatic and heat-up and cool down in under 30 min. All easily initiated using the advanced touch-screen controller. The fermenter was equipped with a pH probe, dissolved oxygen probes, automatic sampler, temperature probe, inoculation port, sparger, exhaust condenser, agitation, vessel light, level sensor and BioCommand SCADA Software (RS-232; New Brunswick Scientific BioFlow 410 SIP Fermentor, Eppendorf, New York, MA, USA).

Four liter of fermentation media (from BFM) were prepared in the fermentor. The initial pH of fermentation was adjusted to 6.5. The fermentation with 4% glucose media was also performed at two aerations and agitations. The fermentor was incubated at 28 °C. The inoculation ratio of two strains (+/−) into the fermentation medium from plate cultures was the same as those in the shake flask. The lycopene cyclase inhibitor of nicotine (5 mM) was added on the second day of fermentation. Dissolved oxygen tension was not controlled during fermentation.

## 2.6. Sampling

Fermented samples were aseptically removed from the shake flask and fermentor through automatic sampler after 2, 3, 4, 6 and 7 days of fermentation. Initial samples were also removed at the beginning of fermentation. At every sampling interval, 5 mL of sample was taken from the fermentation media under aseptic conditions and the contents were analyzed for lycopene, pH and biomass changes. Two ml of the sample was used in lycopene analysis and 3 mL was used in pH and biomass analysis. At each sampling time and after the first day, 0.4 mL of the sample was also removed for morphological analysis.

Two samples were removed and two parallel analyses were performed from each sample. All experiments were repeated three times.

## 2.7. Analysis

### 2.7.1. Lycopene Analysis

Samples were analyzed for lycopene by a High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) method [1]. Two ml of a 5 mL sample was mixed with 15 mL of petroleum ether. The mixture was subjected to ultrasound (Soniprep 150 Ultrasonic Disintegrator, MSE, London, UK) for 30 s and then, the sample was centrifuged using a table-type centrifuge (Hettich eba III) at 6000 rpm for 15 min. The supernatant was passed through 4 µm filter paper. About 2.5 mL of liquid was added into a 3 mL vial and the sample was analyzed by HPLC immediately. The presence of lycopene was detected by HPLC using a fluorescence detector. The flow rate was 1 mL min<sup>−1</sup> and the column was nukleosil C18 (250 × 4.6 mm ID). Temperature was 28 °C. Lycopene was detected at 450 nm and 20 µL sample was injected to HPLC automatically. The result was read for 40 min. The mobile phase was acetonitrile-methanol-water-dichloromethane (7:1.5:0.5:1, v:v:v:v). The mobile phase was filtered through a disposable filter unit (0.45 µm) and degassed in a degasser (Bransonic 2200, 41 Eagle Road Danbury, Connecticut, 06810-1961, CT, USA). The peaks in a chromatogram were evaluated according to the lycopene standard curve.

*Analytical Method Validation:* Linearity was determined between 0.1 to 0.0001 g ml<sup>−1</sup> using five levels of calibration in triplicate. The Mandel's fitting test was used to evaluate the linearity of the straight-line regression model [14].

Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were determined according to the method described by Cucu et al. [15]. For this, standards of 0.1 to 0.0001 g lycopene ml<sup>−1</sup> were prepared and injected three times each. The mean of the slopes (S) and standard deviation of the intercepts (σ) were calculated from the three calibration curves. The LOD and the LOQ were calculated according to the formulas below [15]:

$$\text{LOD} = (3.3 * \sigma) / S$$

$$\text{LOQ} = (10 * \sigma) / S$$

For the assessment of the matrix effect, calibration curves were prepared in the petroleum ether and analyzed in triplicates. The calibration curve of lycopene was the equations:  $y = ((\text{area} + \text{intercept}) / \text{slope})$ .

### 2.7.2. pH, Biomass and Morphological Analysis

In biomass analysis, Whatman No. 41 filter paper was dried at 105 °C to constant weight, cooled in a desiccator and weighed before use. Three ml of the remaining sample was filtered through the filter paper. The filter cake on paper was washed three times with distilled water. The filter paper was placed into an incubator at 105 °C, dried until constant weight and then weighed to calculate the biomass ( $\text{g L}^{-1}$ ). The medium with %10 orange powder was used as a control; in biomass detection, this was subtracted from biomass.

In pH analysis, a filtered solution was filled to 10 mL with distilled water and pH was detected using a pH meter (EMAF EM78X model, Interlab Company, Adana, Turkey) equipped with a glass electrode.

In image analysis, the morphological changes of *B. trispora* during the fermentation was analyzed using an image analysis system consisting of a light microscope (Olympus BX51; Olympus Corporation, Shinjuku Monolith, 3-1, Nishi Shinjuku 2-chome, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan) equipped with a Pixera PVC 100C camera. Samples for image analysis were prepared by mixing 0.4 mL of fermentation broth with 0.1 mL of lactophenol blue. One drop of the mixed sample was pipetted on to a microscope slide, covered by a cover slip so that no air gap or bubbles were trapped between the sample and the coverslip and observed immediately with 20X objective by taking 5 different images. The morphological parameters measured were the area of zygospores and zygospores (% of total area of mycelium), the diameter of zygospores (mm), freely dispersed hyphae and clumps (aggregates) of different sizes on the basis of their projected area, and the hyphae length (mm). The microscope eyepiece is equipped with a scale micrometer that is used to measure the morphological parameters of mold. For each sample, the process was repeated at least 5 times using new positions on the same slide, and the morphological parameters were expressed as the mean values of each sample [16].

### 2.8. Statistical Analysis

All data were analyzed by SPSS 16 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Statistical differences between fermentation time (days) and between substrates used in the fermentations were tested by one-way analysis of variance following Duncan's multiple-range test. A probability of 0.05 was used to determine statistical significance.

## 3. Results

The fermentations were carried out at 28 °C for 7 days using different carbon sources and ingredients in the shake flask and fermentor.

The initial pH is one of the important parameters in the production of lycopene by *B. trispora*. The pH of the fermentation media changed during the fermentation time. The pH of the fermentation media was decreased during the first 2 days then increased during the remaining 7 days. At 2 days, the pH reduced to approximately 5.0, and then the pH increased over 6.0. The pH drop would be due to trisporic acid or/and other unidentified acidic formations in the lycopene production [17]. According to Nanou et al. [18], the pH of the media decreased slightly during the first 2 days of the fermentation from 7.6 to 5.3 and then increased slowly up to 7.0 at the end of the fermentation. The pH of the fermentation media was probably increased by ammonia liberation during degradation of proteins in the media by *B. trispora*. This would be indicative of amine metabolic product being released as a consequence of cell death and subsequent lysis occurring after that time.

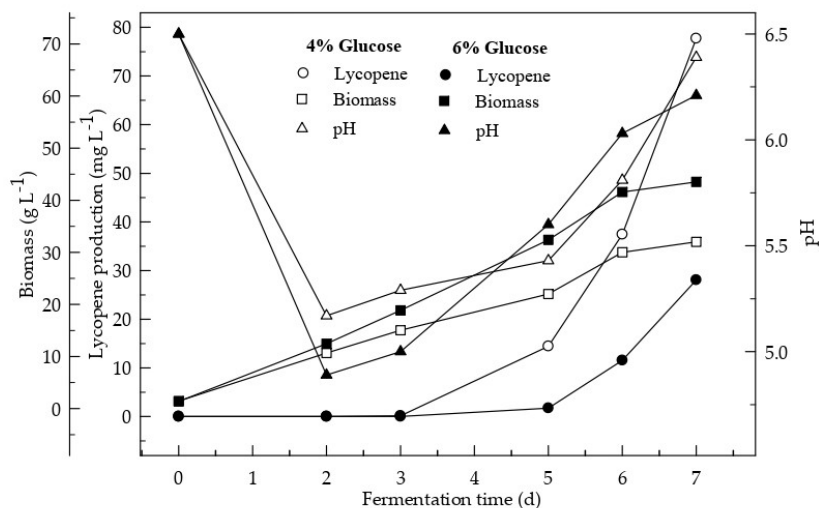
### 3.1. Shake Flask Studies

Lycopene production of two glucose concentrations (4 and 6%) were investigated at two initial pH values (6.5 and 5.5). Figures 1 and 2 show the effect of glucose concentrations on lycopene production at the initial pH 6.5 and 5.5 respectively. Lycopene production at pH 6.5 with both glucose concentrations was higher than at pH 5.5. The amount of lycopene production was 77.7 and 28.1  $\text{mg L}^{-1}$  with 4

and 6% glucose, respectively, after 7 days fermentation at pH 6.5. The biomass dry weight (DW) increased with the increase in glucose concentration from 4 to 6%. The lowest amount of lycopene content ( $0.3 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ ) was obtained at pH 5.5 with glucose concentration 6%. In this research, 4% glucose yielded better lycopene than 6% while the biomass is better produced in 6% glucose. Since, there is an indirect relationship between biomass and lycopene concentration. Subsequently, increasing the glucose concentration to 6% resulted in a decrease in lycopene production by 36.2%. The decreased concentration of lycopene encountered with the highest concentration of glucose was probably due to osmotic effects. It has been reported that above a critical substrate concentration, the decreased water activity and the onset of plasmolysis combine to cause a decrease in the rates of fermentation and product formation [19]. In all cases, the biomass DW increased during the first two days of the fermentation and then remained constant until the maximum concentration of the lycopene was obtained. The maximum lycopene content was  $2.4$  and  $0.6 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$  with 4 and 6% glucose, respectively, at pH 6.5 after 7 days while they were  $0.7$  and  $0.1 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$  after 4 days, respectively. There are significant differences ( $p < 0.05$ ) in lycopene production during fermentation. There are also significant differences ( $p < 0.05$ ) in lycopene production between 4 and 6% glucose concentrations, and pH 6.5 and 5.5 at both glucose concentrations.

Figures 3 and 4 show the effect of sunflower and corn oils, respectively, on the production of lycopene in 4 % glucose medium at initial pH 6.5. The maximum lycopene was produced  $795.1$  and  $714.2 \text{ mg L}^{-1}$  with 1 % sunflower and corn oils respectively. The highest amount of lycopene ( $335.4 \text{ mg L}^{-1}$ ) was produced with 3 % sunflower oil rather 3 % corn oil ( $275.3 \text{ mg L}^{-1}$ ). Lycopene content was  $131.4$  and  $115.0 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$  at the end of fermentation for 1% sunflower and corn oils respectively. There are significant differences ( $p < 0.05$ ) in lycopene production during the 7 days of fermentation. There are also significant differences ( $p < 0.05$ ) in lycopene production with and without oil, and between both oil types.

Lycopene productions with 1 and 2% orange powder during 7 days of shake flask fermentation were given in Figure 5. Lycopene productions after 7 days were  $2.9$  and  $1.7 \text{ mg L}^{-1}$  with 1 and 2% orange powder respectively. Biomasses formations were  $8.6$  and  $11.6 \text{ g L}^{-1}$  for orange powder respectively. Lycopene content was  $0.3$  and  $0.1 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$  respectively at the end of fermentation. There were significant differences ( $p < 0.05$ ) in lycopene production during the 7 days of fermentation for 1 and 2% orange powder, between the two orange powder concentrations.



**Figure 1.** Changes in lycopene production, biomass formation and pH with initial pH 6.5 in a medium containing 4 and 6% glucose.

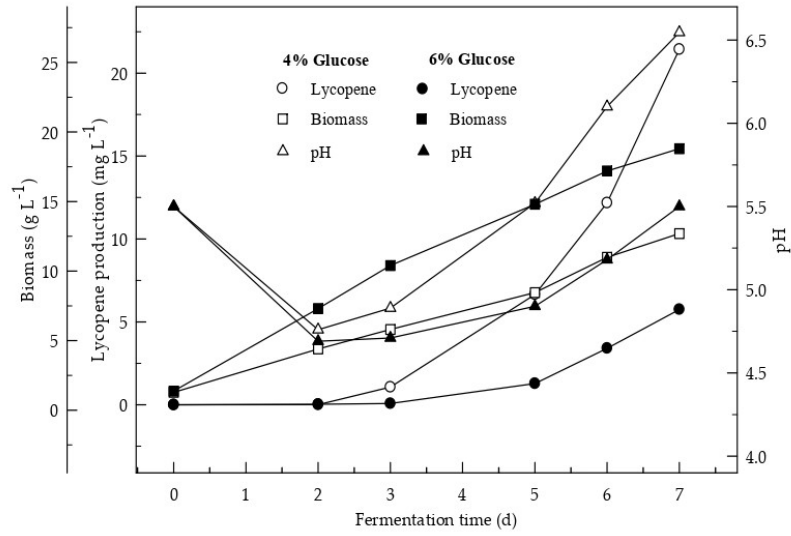


Figure 2. Changes in lycopene production, biomass formation and pH with initial pH 5.5 in a medium containing 4 and 6% glucose.

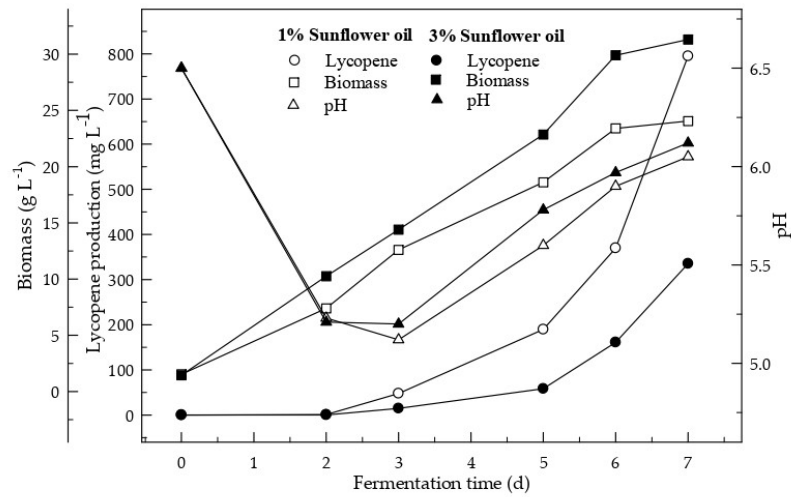
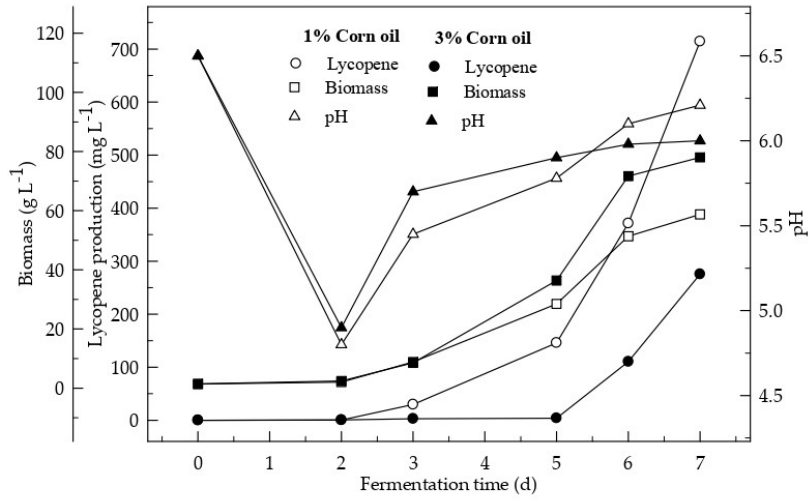
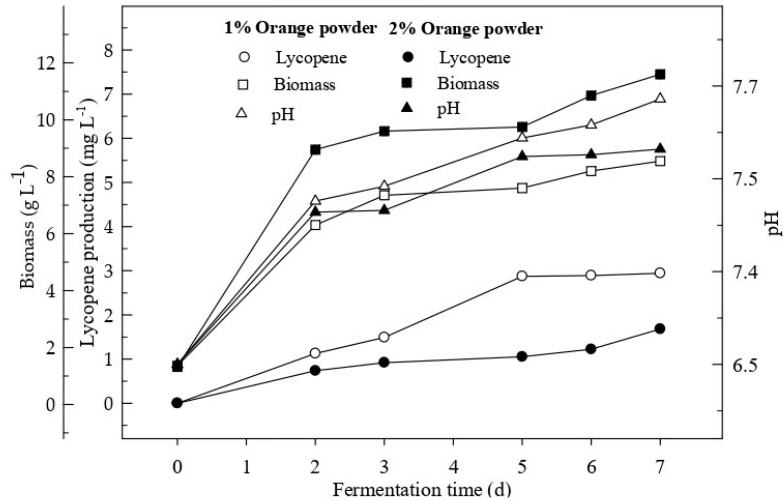


Figure 3. Changes in lycopene production, biomass formation and pH in fermentation with an initial pH 6.5 in a 4% glucose medium containing 1 and 3% sunflower oil.



**Figure 4.** Changes in lycopene production, biomass formation and pH in fermentation with an initial pH 6.5 in a 4% glucose medium containing 1 and 3% corn oil.



**Figure 5.** Changes in lycopene production, biomass formation and pH in a shake-flask fermentation with an initial pH 6.5 in a medium containing 1 and 2% orange powder.

3.2. Fermentor Studies

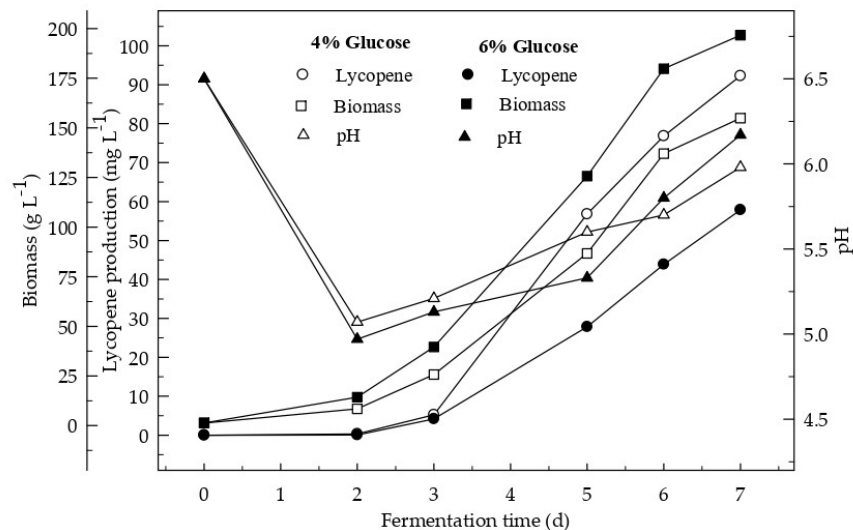
Effects of 4 and 6% glucose concentration (pH 6.5) on the production of lycopene were studied at 3 L min<sup>-1</sup> aeration with 500 rpm agitation (Figure 6). The highest amount of lycopene was produced (92.3 mg L<sup>-1</sup>) with 4% glucose concentration rather than 6% glucose (57.8 mg L<sup>-1</sup>). Biomass DW formations after 7 days of fermentation were 154.9 and 196.7 mg L<sup>-1</sup> with 4 and 6% glucose concentration respectively. Lycopene content was 3.8 and 1.9 mg g<sup>-1</sup> DW at the end of fermentation for 4 and 6% glucose concentrations respectively. There is an indirect relationship between biomass and lycopene formation similar to the shake flask. The production of lycopene in the fermentor was higher than in the shake-flask from glucose. This would be due to the better aeration of the medium in the fermentor. There were significant differences (*p* < 0.05) in lycopene production during the 7 days of

fermentation. There were also significant differences ( $p < 0.05$ ) in lycopene production between 4 and 6% glucose concentrations.

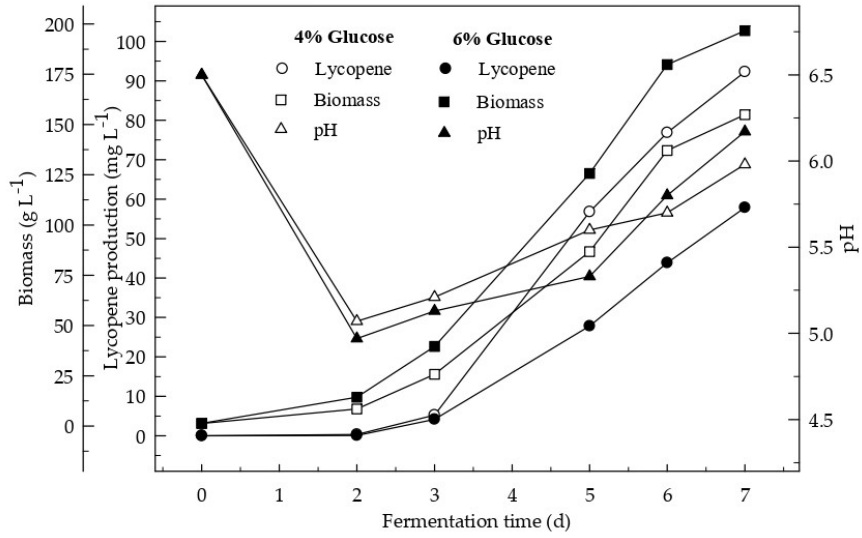
The effect of high level of aeration ( $12 \text{ L min}^{-1}$ ) and agitation (750 rpm) on the production of lycopene in a 4% glucose medium during the 7 days of fermentation is given in Figure 7. The highest amount of lycopene was produced at low level of aeration ( $3 \text{ L min}^{-1}$ ) and agitation (500 rpm) rather than at the high levels ( $12 \text{ L min}^{-1}$  and 750 rpm). The highest amount of biomass was formed at the higher aeration ( $12 \text{ L min}^{-1}$ ) and agitation (750 rpm) rather than at the lower levels. Lycopene content of DW ( $3.8 \text{ mg L}^{-1}$ ) was higher at  $3 \text{ L min}^{-1}$  aeration and 500 rpm agitation rather than  $12 \text{ L min}^{-1}$  at 750 rpm ( $1.8 \text{ mg L}^{-1}$ ). Generally, the results showed that the biomass increased with increasing aeration and agitation. This was due to the better air supply to the cells. This is especially important for high biomass concentrations. *B. trispora* is a strictly aerobic microorganism. Thus, moderate aeration rates in combination with high impeller agitation improved the growth of mold. There are significant differences ( $p < 0.05$ ) in lycopene production during the 7 days of fermentation and between the two fermentation conditions (3 and  $12 \text{ L min}^{-1}$  aeration).

Figure 8 shows the effect of 1% sunflower and corn oils on the lycopene production in the fermentor. Lycopene production was  $944.8$  and  $859.8 \text{ mg L}^{-1}$  respectively. Biomass formations were  $29.5$  and  $19.6 \text{ g L}^{-1}$ . Lycopene content was  $65.0$  and  $48.9 \text{ mg g}^{-1}$  DW. Lycopene production in the presence of sunflower and corn oils in the fermentor was 12.2 and 11.1 times higher, respectively, than without oil from 4% glucose in a shake flask. This would be due to retaining higher amount of oxygen in the media. Since oil slightly increases the density of the fermentation media. There are significant differences ( $p < 0.05$ ) in lycopene production during fermentation periods. There are also significant differences ( $p < 0.05$ ) in lycopene production with and without oil, and between sunflower and corn oils.

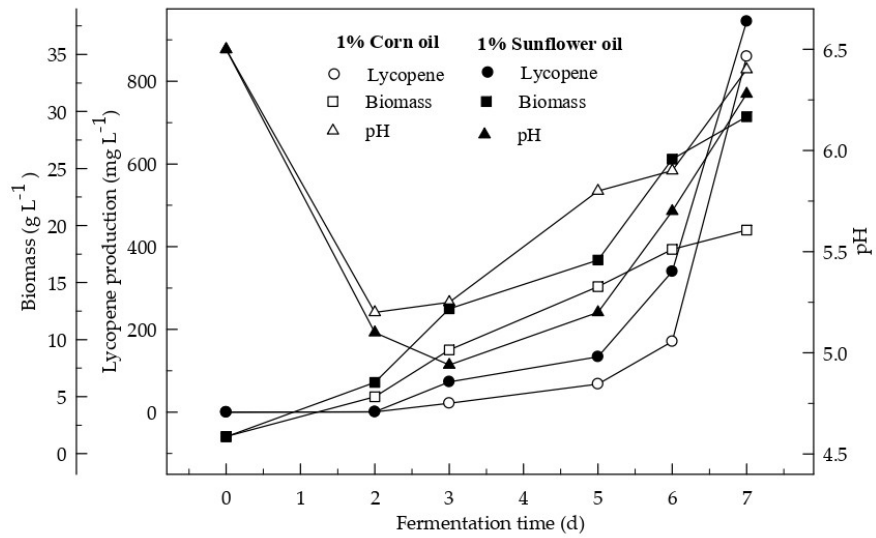
Lycopene production was studied from different concentrations of orange peel in 4 L fermentation media with aeration  $3 \text{ L min}^{-1}$  and agitation 500 rpm (Figure 9). Lycopene was produced  $4.9 \text{ mg L}^{-1}$  with 1% orange peel. Biomass was  $9.7 \text{ g L}^{-1}$  and lycopene content was  $0.05 \text{ mg g}^{-1}$  DW at the end of fermentation. Lycopene production from orange peel was two times higher in the fermentor than in the shake flask. There are significant ( $p < 0.05$ ) differences in lycopene production during the 7 days of fermentation.



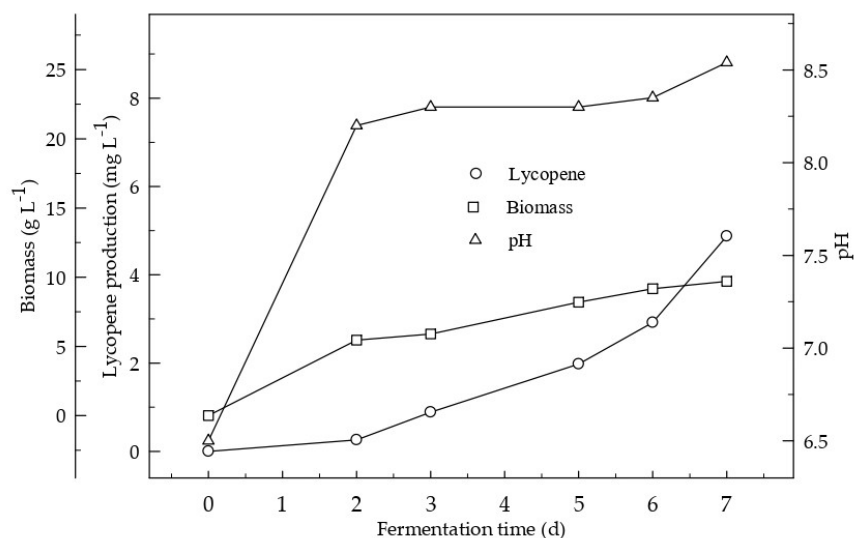
**Figure 6.** Changes in lycopene production, biomass formation and pH in a fermentor with an initial pH 6.5 in a 4 and 6% glucose medium at  $3 \text{ L min}^{-1}$  aeration and 500 rpm agitation.



**Figure 7.** Changes in lycopene production, biomass formation and pH in a fermentor with an initial pH 6.5 in a 4 and 6% glucose medium at 12 L min<sup>-1</sup> aeration and 750 rpm agitation.



**Figure 8.** Changes in lycopene production, biomass formation and pH in a fermentor with an initial pH 6.5 in a 4% glucose fermentation medium 1% corn and sunflower oils (at aeration 3 L min<sup>-1</sup> with 500 rpm agitation).



**Figure 9.** Changes in lycopene production, biomass formation and pH in a fermentor with an initial pH 6.5 from a 1% orange powder in a fermentor with aeration  $3 \text{ L min}^{-1}$  at agitation 500 rpm.

### 3.3. Morphological Analysis

The morphology of *B. trispora* was studied in the shake-flask and fermentor studies ( $3 \text{ L min}^{-1}$  aeration and 500 rpm agitation) in only 4% glucose medium containing 1% sunflower oil using an image analysis system. During the first day of fermentation, microscopic examination showed that *B. trispora* formed a great amount of mycelium in the fermentation broth. After one day of fermentation, two opposite mating types of *B. trispora* produced zygosporangia which grew towards each other and produced pro-gametangia at their tips. Septation in the pro-gametangia led to the production of terminal gametangia, which fused to form the zygosporangia. The area of zygosporangia to the total area of mycelium remained almost constant up to 4 days of fermentation and then decreased significantly ( $p < 0.05$ ) and disappeared on the 7th days of fermentation. On the other hand, the area of zygosporangia to the total area of mycelium increased significantly ( $p < 0.05$ ) with the increase of fermentation time from 4 to 7 days. The hyphae length increased from the first day of fermentation up to 4 days and then slightly increased until the end of the fermentation. The diameter of zygosporangia increased from the first 2 days of incubation up to 4 days and then decreased slightly. Generally, morphological measurements using image analysis showed that *B. trispora* formed zygosporangia, zygosporangia and mycelium in which the hyphae appeared as a homogeneous dispersed suspension through the fermentation medium.

## 4. Discussion

Various concentration of carbon sources and refined natural vegetable oils as co-substrates were used in the production of lycopene. The concentration of carbon sources and vegetable oils greatly affected the final amount of lycopene. Furthermore, the use of orange powder components gives a first indication that *B. trispora* is able to metabolize and produce lycopene.

The highest concentration of lycopene was produced from a low concentration of glucose (4%) rather than at the high concentration (6%) in both the shake flask and fermentor studies. High concentrations of glucose may cause inhibition of the activity of mevalonate kinase [20], which is one of the key enzymes of the lycopene biosynthesis pathway. The carbon source can act as a major constituent for the building of cellular material and as an important energy source during the microbial fermentations [21]. Lycopene production in all fermentation conditions was lower than  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  during the first 2 days of fermentation and continuously increased during the next 5 days. It reached

maximum concentration after 7 days. Sugar metabolism was slightly enhanced at the beginning of fermentation and increased during next fermentation period. This increase may provide more lycopene production [22]. On the other hand, biomass formation increased continuously during the 6 days of fermentation and it slowed on last day. When lycopene production increased, biomass formation decreased. Dry weight increased continuously up to 6 days and then slowed down. But lycopene production rate was higher on the last day. The maximum lycopene content in cells occurred after 7 days of fermentation when compared with 6 days in all fermentation conditions. This indicates that lycopene and biomass formations are inversely proportional. The biomass rapidly increased after 2 days of fermentation and this continued up to 6 days of fermentation. Nanou et al. [18] reported that the concentration of residual sugars fell rapidly during the first 4 days of the fermentation after which it decreased slowly and this was accompanied by a rapid increase of biomass concentration.

The refined vegetable oils stimulate different biosynthetic pathways in *B. trispora*. In this study, about 944.7 mg L<sup>-1</sup> of lycopene was produced in fermentor studies from 4% glucose supplemented with 1% sunflower oil. With 1% corn oil, about 859.8 mg L<sup>-1</sup> of lycopene was produced in a 4% glucose medium. These results indicate that sunflower oil has a greater influence on lycopene production than corn oil due to a higher amount of vitamin E and linoleic acid in sunflower oil [23,24]. Similar results were demonstrated by Mantzouridou et al. [7] that corn steep liquor, olive oil, soybean oil, cottonseed oil and linoleic acids significantly increased the  $\beta$ -carotene production. Mantzouridou et al. [24] was also indicated that the addition of 10 g oil L<sup>-1</sup> of substrate stimulated  $\beta$ -carotene production. Beside triacylglycerol, the main component of oils can be used in the lipid biosynthesis (involving acetyl-CoA formation resulting from  $\beta$ -oxidation of fatty acids) of the mold mycelium. Oils can be hydrolyzed to fatty acids and glycerol by mold exolipases [23]. When the concentration of natural oils increases (from 1 to 3%), the production of the lycopene decreases while the biomass dry weight increases significantly. This may be related to the consumed amount of the oils converted to biomass instead of lycopene. The production of lycopene without oils in the medium was lower while biomass formation was higher.

Two different aerations (3 and 12 L min<sup>-1</sup>) and agitations (500 and 750 rpm) were studied in a 7 L fermentor (pH 6.5). The highest amount of lycopene 944.8 mg L<sup>-1</sup> was produced with 3 L min<sup>-1</sup> aeration and 500 rpm agitation in 4% glucose medium containing 1% sunflower oil. The positive impact of oils in the production of lycopene has been confirmed in other reports, such as those based on the use of crude olive or soybean olive [7,24] or waste cooked oil [25]. Supplementation of the medium with industrial glycerol, obtained either from soap manufacturing or biodiesel production industries, allows up to a tenfold increase in  $\beta$ -carotene levels [26]. Very promising results have been also obtained using agro-food wastes rich in carbohydrates and mineral salts, as beet molasses [27], cheese whey [28]. The concentration of lycopene was higher in fermentor studies than in the shake flask. Aeration could be beneficial to the growth and performance of aerobic *B. trispora*. Agitation of the fermentation medium creates shear forces which affect microorganisms in several ways: causing morphological changes, variation in their growth and product formation, and damaging the cell structure [19].

Orange powder was used as a raw material for production of lycopene in a shake flask and fermentor. The highest amount of lycopene (4.8 mg L<sup>-1</sup>) was produced in the fermentor with 1% orange powder rather than in the shake flask (2.9 mg L<sup>-1</sup>). Citrus peels are rich in cellulose, hemicelluloses, proteins and pectin, but the fat content is low. Pourbafrani et al. [21] reported that more than 95% of the peel oil is D-limonene which is extremely toxic to fermenting microorganisms. The addition of tomato sauce as a waste into the fermentation medium enhanced the production of lycopene and its production was 3.52 mg/100 g cell DW [29].

*B. trispora* is a micro-fungus with a life-cycle involving hyphae, zygothores and zygosporangia in submerged fermentation. The zygothores are the precursors of zygosporangia, which are responsible for the production of lycopene. [19]. The highest percentage of zygosporangia in an observed microscope field was correlated with the highest percentage of intracellular lycopene in the total biomass dry

weight after the 7 days of fermentation. High percentages of vacuolated hyphae, evacuated cells and degenerated hyphae of *B. trispora* were observed at higher aeration ( $12 \text{ L min}^{-1}$ ). The percentage of the vacuolated hyphae, evacuated cells and the degenerated hyphae formed during the first 2 days of fermentation were higher than the remaining fermentation time. The growing mycelium was composed primarily of intact hyphae (such as 96.8% of the biomass dry weight), and zygospores on the 2nd day of fermentation, whereas on the next day the concentration of the intact hyphae was reduced to 67.9 of the biomass dry weight and the concentration of the zygospores was about 8.3%. On the 7th day of fermentation, the mycelium was composed mainly of evacuated cells. The addition of 1% oils to the fermentation medium increased the concentration of the intracellular lycopene during fermentation and reached to maximum level after 7 days, whereas the percentage of zygospores to the biomass dry weight increased significantly ( $p < 0.05$ ). The highest concentration of lycopene correlated with the highest percentage of zygospores in the biomass DW. When the natural oils were used in the medium with 4% glucose in the fermentor, a great increase in the amount of lycopene occurred after the days 7 of fermentation, while the concentration of evacuated cells and the number of zygospores increased significantly ( $p < 0.05$ ).

The effect of aeration rate and agitation speed on culture morphology was also observed. At an aeration rate of  $3 \text{ L min}^{-1}$  with 500 rpm agitation, the area of zygospores increased significantly and then remained constant. On the other hand, at aeration rates of  $12 \text{ L min}^{-1}$  with 750 rpm agitation, the area of zygospores decreased and then remained constant. The maximum concentration of lycopene was observed in the same conditions where a large number of zygospores were observed. This means that the zygospores were responsible for the synthesis of lycopene.

## 5. Conclusions

In this study, various substrates are compared with lycopene production in the shake flask and fermentor. The amount of lycopene production is based on the concentration of carbon sources and natural oil content. The amount of orange powder used in the fermentation as carbon sources affected the formation of lycopene. The use of natural oil is important for stimulation of the biosynthetic pathway in *B. trispora*. The medium with natural oil led to more lycopene than only carbon source in the medium. The oils degraded into acetyl-CoA, which is the precursor of lycopene derived from mevalonic acid. The mated fermentation process for lycopene production may be useful and a reference to the other fermentation. Also, lycopene production from *B. trispora* is better than other alternative plant extracts which is one of the other methods of lycopene production. For the future, this study is provided to contribute to the development in the lycopene production industry from this method. Oils improved lycopene production and enhanced vacuolation and evacuation of the hyphae. The morphological characteristics of the hyphae and the proportion of zygospores to the biomass DW were changed significantly ( $p < 0.05$ ) within the medium composition and fermentation conditions. Moreover, there was a parallel relationship between the area of zygospores and production of lycopene. Generally, the results showed that *B. trispora* is a micro-mold that produces lycopene with a life-cycle involving hyphae, zygophores and zygospores. The hyphae do not play a role in the biosynthesis of lycopene. The zygophores are the precursors of zygospores, which are responsible for the production of the lycopene. Maximum lycopene concentration was obtained when the medium was supplied with sunflower and corn oils.

**Author Contributions:** Examined the literature, methodology, original draft, writing-review and editing, supervision: O.E.; Performed the analysis, investigation, literature survey: A.S.

**Funding:** This research received no external funding.

**Acknowledgments:** The author acknowledges the support received from the Gaziantep University.

**Conflicts of Interest:** The author declares no conflict of interest.



## Engineering membrane morphology and manipulating synthesis for increased lycopene accumulation in *Escherichia coli* cell factories

Tao Wu<sup>1,2</sup> · Lijun Ye<sup>2</sup> · Dongdong Zhao<sup>2</sup> · Siwei Li<sup>2</sup> · Qingyan Li<sup>2</sup> · Bolin Zhang<sup>1</sup> · Changhao Bi<sup>2</sup>

Received: 19 January 2018 / Accepted: 20 May 2018 / Published online: 25 May 2018  
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

### Abstract

The goal of this work was to improve the lycopene storage capacity of the *E. coli* membrane by engineering both morphological and biosynthetic aspects. First, *Almgs*, a protein from *Acholeplasma laidlawii* that is involved in membrane bending is overexpressed to expand the storage space for lycopene, which resulted in a 12% increase of specific lycopene production. Second, several genes related to the membrane-synthesis pathway in *E. coli*, including *plsb*, *plsc*, and *dgka*, were also overexpressed, which led to a further 13% increase. In addition, membrane separation and component analysis confirmed that the increased amount of lycopene was mainly accumulated within the cell membranes. Finally, by integrating both aforementioned modification strategies, a synergistic effect could be observed which caused a 1.32-fold increase of specific lycopene production, from the 27.5 mg/g of the parent to 36.4 mg/g DCW in the engineered strain. This work demonstrates that membrane engineering is a feasible strategy for increasing the production and accumulation of lycopene in *E. coli*.

**Keywords** Membrane morphology · Membrane synthesis · Lycopene · Production · *Escherichia coli*

### Introduction

Lycopene is one of the major precursors of downstream carotenoids produced by many plants and microorganisms. It is of great economic interest due to its attractive anti-oxidative, anti-cancer, and anti-inflammatory activities, and has been widely used in the pharmaceutical, nutraceutical, cosmetics, and food industries (Nagao and Yoshikawa 2009).

Lycopene has been produced by extraction (Clinton 1998), chemical synthesis (Michael and Bausch 2003), and fermentation (Mantzouridou and Tsimidou 2008). Because the lycopene content of tomatoes is low (approx. 0.02 g/kg) and because of the presence of many other carotenoids (Clinton 1998), the extraction method is relatively expensive. Engineering microorganisms to produce lycopene to meet the increasing demand has consequently attracted much attention, with a particular focus on *Escherichia coli* (Ajikumar et al. 2008; Bhataya et al. 2009). This is not only due to the potential benefits of lycopene for human health as an antioxidant (Rao and Agarwal 2000), but more importantly because lycopene has been extensively investigated as a model target for metabolic engineering (Farmer and Liao 2000; Wang et al. 2009; Alper et al. 2005). Up to now, several strategies have been employed to improve lycopene production in *E. coli*: first, overexpressing the native

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s13205-018-1298-8>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Bolin Zhang  
 Zhangbolin888@sina.com.cn

✉ Changhao Bi  
 bi\_ch@tib.cas.cn

Tao Wu  
 wutao@tib.cas.cn

Lijun Ye  
 ye\_lj@tib.cas.cn

Dongdong Zhao  
 zhao\_dd@tib.cas.cn

Siwei Li  
 li\_sw@tib.cas.cn

Qingyan Li  
 li\_qy@tib.cas.cn

<sup>1</sup> College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, People's Republic of China

<sup>2</sup> Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, People's Republic of China

2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate (MEP) pathway (Choi et al. 2010; Jin and Stephanopoulos 2007) or introducing a heterologous mevalonate (MVA) pathway into *E. coli* to increase the supply of isoprenoid synthesis precursors isopentenyl pyrophosphate (IPP) and dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP) (Yoon et al. 2007; Martin et al. 2003); second, identification of gene knockouts or amplification targets for improving lycopene production through systematic and combinatorial methods (Kang et al. 2005; Jin and Stephanopoulos 2007; Choi et al. 2010; Alper et al. 2005); third, the optimization of fermentation processes, for example, by adding auxiliary carbon sources (Kim et al. 2011) as well as maintaining high O<sub>2</sub> levels and appropriate pH values was used to improve lycopene production (Yoon et al. 2006). In addition, optimization of the NADPH and ATP levels is an effective approach for enhancing lycopene production (Tao et al. 2014).

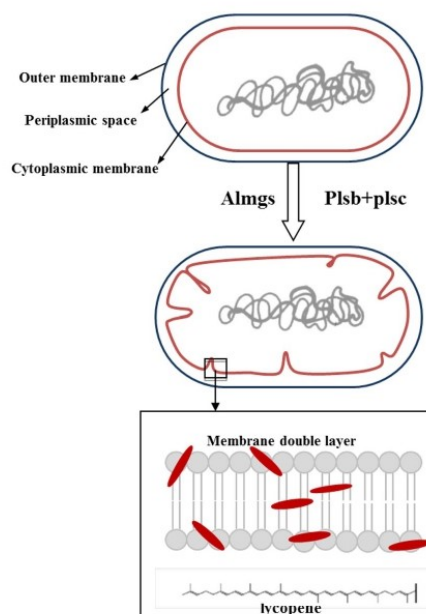
Hydrophobic terpene products are considered to accumulate in the membrane compartment of *E. coli* (Ahrazem et al. 2016). In the previous work (Wu et al. 2017), we engineered the membrane by overexpressing membrane-bending proteins, which increased the  $\beta$ -carotene specific production. Lycopene is a representative hydrophobic molecule with a long straight chain composed entirely of carbon and hydrogen atoms. In fact, the molecular structure of lycopene is quite similar to alkanes, oils and fats, but different from that of  $\beta$ -carotene, which contains hydrocarbon rings.

In this work, we aimed to apply the membrane engineering strategy to a lycopene hyper-producing strain of *E. coli* by introducing membrane-bending proteins and enhancing the membrane-synthesis pathway, to study how this strategy would affect the production and accumulation of lycopene (Fig. 1).

## Materials and methods

### Strains, medium, and culture conditions

All bacterial strains used for DNA manipulation and lycopene production in this study are listed in Table 1. The lycopene-producing strain LYC101 was used as the parent strain for the membrane engineering practice. For strain construction, cultures were grown aerobically at 30 or 37 °C in Luria broth (per liter: 10 g tryptone, 5 g yeast extract, and 10 g NaCl). For lycopene production, single colonies were picked from LB plates and transferred into 15 mm × 100 mm tubes containing 4 mL of LB with or without 34 mg/L of chloramphenicol, and cultured at 37 °C and 250 rpm overnight. The resulting seed cultures were used to inoculate 100 mL flasks containing 10 mL of fermentation medium to an initial OD<sub>600</sub> of 0.05, and grown at 37 °C and 250 rpm.



**Fig. 1** Membrane engineering strategies for increasing lycopene production and accumulation. Membrane morphology and the membrane-synthesis pathway were engineered to improve the production and accumulation of lycopene in *E. coli*

For strains bearing the P<sub>trc</sub> promoter, 1 mM IPTG was added 3 h after inoculation, which was followed by 93 h of growth. The fermentation medium contained (per liter): 15 g glycerol, 1.7 g citric acid, 10.5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, 6 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3.44 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, and 10 mL trace metal solution. The trace metal solution contained (per liter): 10 g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 5.25 g ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 3.0 g CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.5 g MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.23 g Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O, 2.0 g CaCl<sub>2</sub>, and 0.1 g (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>. After 48 h of growth, cells were collected for measurement of lycopene production and after which 1.5% (w/v) glycerol was added into the culture medium for another 48 h continued fermentation. After 96 h of fermentation, the cells were collected for the measurement of lycopene production.

### Plasmids construction

All plasmids used in this study are listed in Table 1. Plasmids were assembled using the Golden Gate method (Hillson et al. 2012). We applied several plasmids used in article (Wu et al. 2017) in this study. All primers were synthesized by Genewiz (Beijing, China) and are listed in Supplementary Table 1. Gene sequencing was also carried out by Genewiz.

**Table 1** Strains and plasmids used in this work

Strains and plasmids	Relative characteristics	Resources
<b>Strains</b>		
CAR005	ATCC 8739, M1-37:: <i>dxs</i> , M1-46:: <i>idi</i> M1-93:: <i>Crt</i> , M1-46:: <i>SucAB</i> , M1-46:: <i>sdh</i> , M1-46:: <i>talB</i>	Lab collection
CAR015	CAR005, <i>ispG</i> -mRSL-4, <i>ispH</i> -mRSL-14	Lab collection
CAR025	CAR015, replacing the promoter of <i>crtEYIB</i> with P <sub>trc</sub> promoter	Lab collection
LYC101	CAR025, $\Delta$ <i>crtY</i>	Lab collection
LYC101-37Almgs	LYC101, M1-37::Almgs	This work
LYC101-46Almgs	LYC101, M1-46::Almgs	This work
<b>Plasmids</b>		
pACYC184-M	cat; replace <i>tet</i> with <i>lacI</i> and P <sub>trc</sub> of pTrc99A-M	Lab collection
pCas9	Cas9	(Zhao et al. 2016)
pAlmgs	pACYC184-M with P <sub>trc</sub> controlled <i>almgs</i>	This work
pMtlA	pACYC184-M with P <sub>trc</sub> controlled <i>mtlA</i>	This work
pTsr	pACYC184-M with P <sub>trc</sub> controlled <i>tsr</i>	This work
pPlsb	pACYC184-M with P <sub>trc</sub> controlled <i>plsb</i>	This work
pPlsb-plsc	pACYC184-M with P <sub>trc</sub> controlled <i>plsb</i> and <i>plsc</i>	This work
pPlsb-plsc-dgka	pACYC184-M with P <sub>trc</sub> controlled <i>plsb</i> , <i>plsc</i> , and <i>dgka</i>	This work

### Integration of *almgs* into the *E. coli* chromosome

The plasmids pM1-37Almgs and pM1-46Almgs were constructed to integrate *almgs* (monoglucosyldiacylglycerol synthase from *A. laidlawii*) into the *E. coli* chromosome under the control of the M1-37 and M1-46 promoter, respectively. Each integration plasmid also contained homologous arms for integration and gRNA with an N20 sequence. The plasmid pCas9 was co-electroporated with each of the plasmids into the lycopene-producing strain LYC101 and the resulting strains were processed using the Cas9 genome editing protocol as described previously (Zhao et al. 2016), yielding the *almgs* integration strains.

### Analysis of lycopene production

The lycopene titers were quantified by measuring the absorption at 480 nm of acetone extracts of the cells as described previously (Yuan et al. 2006) with some modifications as follows: cells were harvested by centrifugation at 16,200×g for 3 min, resuspended in 1 mL of acetone, incubated at 55 °C for 15 min in the dark, and centrifuged at 16,200×g for 10 min, and the acetone supernatant containing lycopene transferred to a new tube. The lycopene content was analyzed using HPLC (Agilent Technologies Series 1200 system, Agilent, USA) with a variable wavelength detector set to 480 nm and a Symmetry C18 column (250 mm×4.6 mm, 5 μm, Waters, Ireland). Methanol/acetonitrile/dichloromethane (21:21:8, by vol) was used as the mobile phase at 1 mL/min and the column was kept at 30 °C (Yoon et al. 2009). The results represent the means ± S.D. of three independent experiments. Dry cell

weight (DCW) was calculated according to the empirical formula: 1 OD<sub>600</sub> = 0.323 g DCW/L.

### Extraction of cell membranes from strains derived from LYC101

Cell membranes of the strains derived from LYC101 were extracted as described previously (Herskovits et al. 2002; Lu et al. 2014) with some modifications as follows: After induction at 37 °C for 48 h, the cells were collected and resuspended in buffer (50 mM Tris/HCl pH 7.5 and 150 mM NaCl). Following cell disruption by passing the suspension four times through a French Press (JN-3000plus, China) at 8000 psi, cell debris was removed by centrifugation at 8500g for 40 min. The supernatant was collected and centrifuged at 210,000×g for 1 h using a Beckman Optima L-100XP ultracentrifuge equipped with a Beckman-Coulter 41Ti rotor (Beckman-Coulter, Germany). The membrane fraction was collected at the bottom of the centrifuge tube as a pellet and stored at – 80 °C for further analysis.

### Analysis of lycopene content in the cell membranes

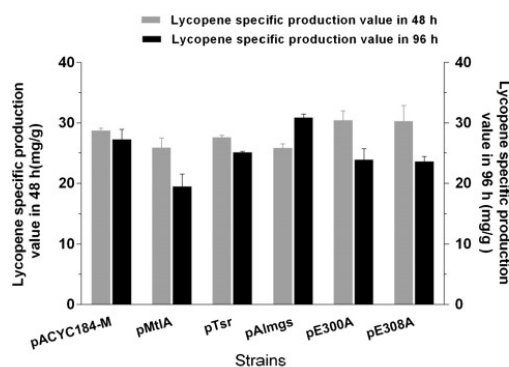
The harvested cell membranes were resuspended in 10 mL of acetone, incubated at 55 °C for 15 min in the dark, and centrifuged at 16,200×g for 10 min. The acetone supernatant fraction containing lycopene was collected and quantified as described above. The lycopene content in the cell debris was analyzed using the same method.

## Results and discussion

### Engineering membrane morphology to improve lycopene production

To study the relationship between membrane surface area and lycopene production in *E. coli*, proteins reported to induce the formation of membrane stacks or vesicles were overexpressed in the previously engineered lycopene-producing strain LYC101 (Table 1). The membrane-bending proteins used in this study include the mannitol permease MtlA (van Weeghel et al. 1990) and the chemotaxis receptor Tsr (Herskovits et al. 2002), as well as Almgs and its two functionally-defective mutants, E300A and E308A (Eriksson et al. 2009). The medium-copy plasmid pACYC184-M was used to express these genes under the control of the P<sub>trc</sub> promoter. Among the membrane-bending proteins, Almgs had the highest impact (Fig. 2). The strain LYC101(pAlmgs) produced 327.2 mg/L lycopene with a specific production of 30.8 mg/g DCW after 96 h of growth, which was 20.7% and 12% higher than the corresponding values of the parent strain, respectively (Fig. 2, Supplementary Fig. 1).

Thus, expression of proteins with a membrane-bending function actually improved lycopene production in *E. coli*, suggesting that membrane engineering is broadly applicable for increasing the production of hydrophobic terpenes, and even other products with similar storage mechanisms. Among all the tested proteins, Eriksson et al. (2009) observed the most extensive formation of intracellular vesicles with the expression of Almgs. In agreement with this, we achieved the highest lycopene production with the same protein after 96 h of growth (Fig. 2, Supplementary

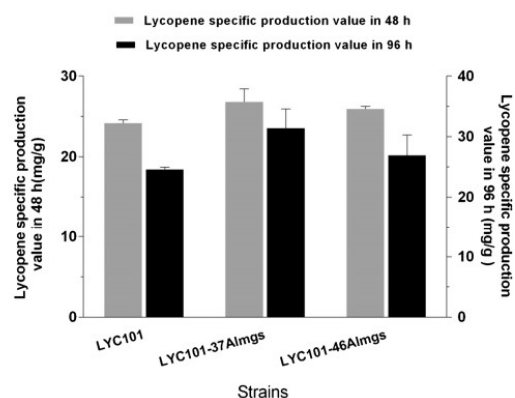


**Fig. 2** Lycopene-specific production of strain LYC101 expressing various membrane-bending proteins in 48 and 96 h. The overexpressed genes included *mtlA*, *tsr*, *almgs*, *almgs*-E300A, and *almgs*-E308A. Three repeats were performed for each strain, and the error bars represent standard deviation

Fig. 1). Furthermore, with the supplementation of glycerol after 48 h of culture, all strains grew further, whereby the strain LYC101(pAlmgs) maintained a higher specific production of lycopene, which suggested that the Almgs protein helped the cells produce sufficient intracellular membrane vesicles in the lycopene accumulation period, and thus provided more space for lycopene accumulation.

### Integrating *almgs* into the chromosome and modulating its expression

Since the plasmid-based expression of *almgs* showed the most promising results after 96 h of growth, it was integrated into the chromosome of strain LYC101 to yield two strains, each using one of the two different regulatory parts M1-46 and M1-37 (Lu et al. 2012). The strengths of these regulatory parts were 1.7 and 2.5 times the strength of a fully induced *E. coli lacZ* promoter (Lu et al. 2012). Both engineered strains had higher specific lycopene production values than the parent strain LYC101 with and without the *almgs* expression plasmid, among which *almgs* expression under the control of M1-37 gave the highest specific production and titer (29.4 mg/g DCW and 302.5 mg/L, respectively) (Fig. 3, Supplementary Fig. 2). The results suggested that an intermediate expression level was the most appropriate for this specific application.

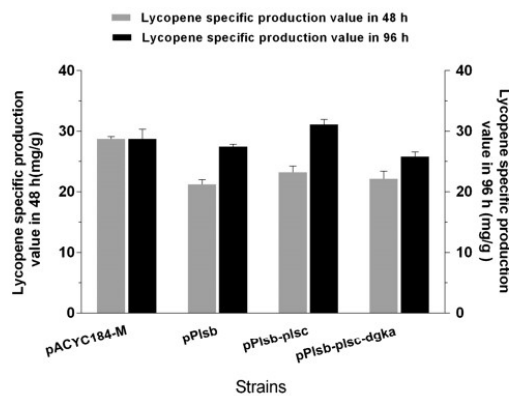


**Fig. 3** Lycopene-specific production of engineered *E. coli* strains obtained by integrating *almgs* into the chromosome of strain LYC101, followed by gene expression modulation. The expression of the *Almgs* gene was modulated using two different promoters (M1-37 and M1-46). Three repeats were performed for each strain, and the error bars represent standard deviation

### Engineering the membrane-synthesis pathway to improve lycopene production

The inner membrane of *E. coli* is a glycerophospholipid bilayer, which contains three major phospholipids: phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylglycerol (PG), and cardiolipin (CL) (also called diphosphatidyl glycerol) (Cronan and Rock 2008). Plsb (glycerol-3-phosphate-acyltransferase), Plsc (1-acylglycerol-3-phosphate-acyltransferase), and Dgka (diacylglycerol kinase) are the key enzymes of the diglyceride-3-phosphate synthesis pathway, the overexpression of which was reported to increase the amount of glycerophospholipids in *E. coli* cells (Janßen and Steinbüchel 2014). In this work, we overexpressed *plsb* alone, *plsb* with *plsc*, or *plsb* with both *plsc* and *dgka* to engineer membrane synthesis to enhance lycopene accumulation.

As illustrated in Fig. 4 and Supplementary Fig. 3, the specific production and titer of lycopene of the engineered strains were, indeed, improved compared with the parent strain. The strain LYC101(pPlsb-plsc) was the best performer, with a production of 31.1 mg/g DCW and 297.5 mg/L lycopene. The simultaneous overexpression of *plsb* and *plsc* enhanced the pathway flux towards diglyceride-3-phosphate synthesis, which also increased the amount of membrane structures and provided more space to store lycopene.

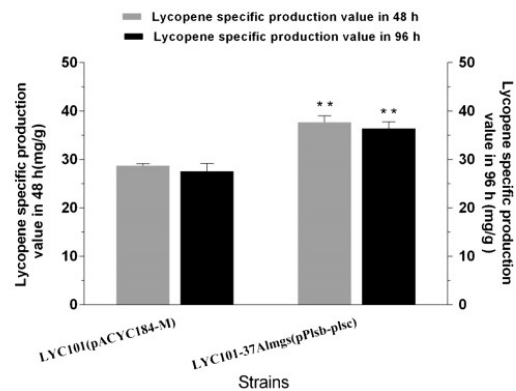


**Fig. 4** Lycopene-specific production of strains obtained from LYC101 by overexpressing membrane-synthesis genes in 48 and 96 h. Overexpression plasmids included pPlsb, pPlsb-plsc, and pPlsb-plsc-dgka. Three repeats were performed for each strain, and the error bars represent standard deviation

### The combined engineering of membrane synthesis and membrane morphology further improved lycopene production

To combine membrane synthesis and membrane morphology engineering strategies in one strain, the plasmid pPlsb-plsc was introduced into LYC101-37Almgs to study possible synergistic effects of their combined expression. As illustrated in Fig. 5 and Supplementary Fig. 4, the strain LYC101-37Almgs(pPlsb-plsc) had a more pronounced increase of lycopene production which reached 216.3 mg/L lycopene with a specific production of 37.7 mg/g DCW at 48 h, and 358.9 mg/L lycopene with 36.4 mg/g DCW at 96 h. After 96 h of growth, the titer of all strains was increased, but, since more carbon source was used for cell growth, it was reasonable that specific production of some strains was decreased slightly.

Compared with the original strain LYC101(pACYC184-M), the lycopene titer and specific production increased 26.7 and 26% after 48 h of growth, respectively. Furthermore, the lycopene titer and specific production increased 27 and 30% after 96 h of growth, respectively (Fig. 5 and Supplementary Fig. 4). The significant lycopene production improvement ( $P < 0.01$ ) in strain LYC101-37Almgs(pPlsb-plsc) suggested a synergistic effect of membrane synthesis and membrane morphology engineering. As we have stated in the previous paper, at the level of membrane morphology engineering, Almgs induced the formation of membrane stacks or tubules and increased the membrane surface area, which probably increased the demand for membrane building blocks needed to fulfill such an increase. Thus, the overexpression of *plsb*



**Fig. 5** Lycopene-specific production of strain LYC101-37Almgs overexpressing *plsb*+*plsc*. Three repeats were performed for each strain, and the error bars represent standard deviation. The significance of differences was calculated by one-way ANOVA; asterisks indicate a significant difference compared with the control (\*\* $P < 0.01$ )

and *plsc* enhanced membrane synthesis, accommodated the demand for membrane building blocks, and achieved a synergistic effect on lycopene production.

### Lycopene was mainly accumulated within the cell membranes

To further determine whether the accumulated lycopene was localized within the cell membranes, the membrane fraction was extracted as described previously (Herskovits et al. 2002; Lu et al. 2014) with some modifications, and acetone was used to extract the lycopene from the collected membranes for analysis. As shown in Table 2, the lycopene titers in the cell debris was low, and the majority of the lycopene content was associated with the cell membrane fraction in all strains. In the original lycopene-producing strains LYC101(pACYC184-M), lycopene in the cell membranes accounted for 55% of the total lycopene content. By contrast, in the engineered strain LYC101-37Almgs(pPlsB-plsC), the membrane-associated lycopene fraction increased markedly, reaching to 73.2% of the total content. It should be noted that the apparent total content of lycopene decreased in the process of membrane extraction. For example, LYC101-37Almgs(pPlsB-plsC) produced 187.6 mg/L lycopene. After extraction, the total lycopene from the two portions only added up to 103 mg/L, indicating a more than 45% loss.

Nevertheless, considering the complex cell manipulation and lycopene extraction procedure, we considered the loss reasonable.

The results proved that lycopene, a representative hydrophobic molecule with straight long hydrocarbon chain, was also mainly accumulated in the membrane compartment of *E. coli* cell factories, which is probably true for other compounds with such characteristics. The experiments also demonstrated that engineering the cell membrane increased the accumulation of lycopene within it, and led to an overall increase of lycopene production, similar to our previous work has shown for  $\beta$ -carotene, implying that this strategy may, indeed, be broadly applicable.

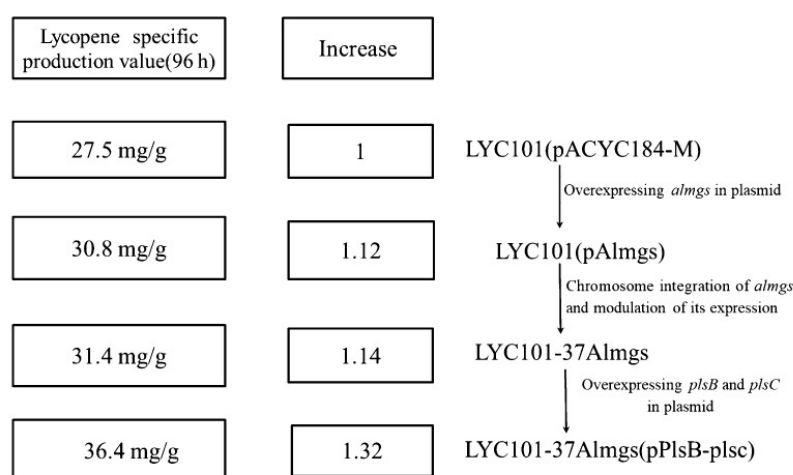
### Conclusion

In this work, the membrane of *E. coli* was engineered in both morphological and biosynthetic aspects, which improved its storage capacity for lycopene. Through membrane engineering, a lycopene-producing strain was obtained which exhibited a 1.32-fold-specific production increase over the parent strain (Fig. 6). It appears increasingly likely that microbial cell factories for a wide range of hydrophobic products, such as alkanes, oils, fats, and a

**Table 2** Lycopene contents in different portions of engineered *E. coli* strains

Strains	Cell debris (mg/L)	Cell membrane (mg/L)	Ratio (lycopene in cell membrane/total lycopene content)
LYC101(pACYC184-M)	36.33 ± 0.99	45.10 ± 4.79	55.4%
LYC101-37Almgs(pPlsB-plsC)	27.84 ± 1.14	75.89 ± 5.26	73.2%

**Fig. 6** Diagram summarizing the increase of lycopene-specific production obtained through membrane engineering



range of important hydrophobic natural products, can be further improved using this novel engineering strategy.

**Acknowledgements** This research was financially supported by the National Natural Science Foundation of China (31522002), National High Technology Research and Development Program of China (2015AA020202), Tianjin Key Technology R&D program of Tianjin Municipal Science and Technology Commission (14ZCZDSY00067), and Novo Nordisk-Chinese Academy of Sciences (NN-CAS) Research Fund (NN-CAS-2015-2).

**Author Contributions** WT performed research, analyzed data, designed research, and wrote the paper; YL, ZD, and LS designed research and analyzed data; LQ provided the bacteria; BC and ZB designed research, analyzed data, and wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare no competing financial interests.

### References

- Ahrazem O, Rubio-Moraga A, Berman J, Capell T, Christou P, Zhu C, Gomez-Gomez L (2016) The carotenoid cleavage dioxygenase CCD2 catalysing the synthesis of crocetin in spring crocuses and saffron is a plastidial enzyme. *New Phytol* 209(2):650–663. <https://doi.org/10.1111/nph.13609>
- Ajikumar PK, Tyo K, Carlsen S, Mucha O, Phon TH, Stephanopoulos G (2008) Terpenoids: opportunities for biosynthesis of natural product drugs using engineered microorganisms. *Mol Pharm* 5(2):167
- Alper H, Jin YS, Moxley JF, Stephanopoulos G (2005) Identifying gene targets for the metabolic engineering of lycopene biosynthesis in *Escherichia coli*. *Metab Eng* 7(3):155–164
- Bhataya A, Schmidt-Dannert C, Lee PC (2009) Metabolic engineering of *Pichia pastoris* X-33 for lycopene production. *Process Biochem* 44(10):1095–1102
- Choi HS, Lee SY, Kim TY, Woo HM (2010) In silico identification of gene amplification targets for improvement of lycopene production. *Appl Environ Microbiol* 76(10):3097–3105. <https://doi.org/10.1128/aem.00115-10>
- Clinton SK (1998) Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease. *Nutr Rev* 56(2):35–51
- Cronan JE Jr, Rock CO (2008) Biosynthesis of membrane lipids. *EcoSal Plus*. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.3.6.4>
- Eriksson HM, Wessman P, Ge C, Edwards K, Wieslander A (2009) Massive formation of intracellular membrane vesicles in *Escherichia coli* by a monotopic membrane-bound lipid glycosyltransferase. *J Biol Chem* 284(49):33904–33914. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.021618>
- Farmer WR, Liao JC (2000) Improving lycopene production in *Escherichia coli* by engineering metabolic control. *Nat Biotechnol* 18(5):533–537
- Herskovits AA, Shimoni E, Minsky A, Bibi E (2002) Accumulation of endoplasmic membranes and novel membrane-bound ribosome-signal recognition particle receptor complexes in *Escherichia coli*. *J Cell Biol* 159(3):403–410. <https://doi.org/10.1083/jcb.200204144>
- Hillson NJ, Rosengarten RD, Keasling JD (2012) j5 DNA assembly design automation software. *ACS Synth Biol* 1(1):14–21. <https://doi.org/10.1021/sb2000116>
- Janßen HJ, Steinbüchel A (2014) Fatty acid synthesis in *Escherichia coli* and its applications towards the production of fatty acid based biofuels. *Biotechnol Biofuels* 7(1):7
- Jin YS, Stephanopoulos G (2007) Multi-dimensional gene target search for improving lycopene biosynthesis in *Escherichia coli*. *Metab Eng* 9(4):337–347. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2007.03.003>
- Kang MJ, Lee YM, Yoon SH, Kim JH, Ock SW, Jung KH, Shin YC, Keasling JD, Kim SW (2005) Identification of genes affecting lycopene accumulation in *Escherichia coli* using a shot-gun method. *Biotechnol Bioeng* 91(5):636
- Kim YS, Lee JH, Kim NH, Yeom SJ, Kim SW, Oh DK (2011) Increase of lycopene production by supplementing auxiliary carbon sources in metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 90(2):489–497
- Lu J, Tang J, Liu Y, Zhu X, Zhang T, Zhang X (2012) Combinatorial modulation of galP and glk gene expression for improved alternative glucose utilization. *Appl Microbiol Biotechnol* 93(6):2455–2462. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3752-y>
- Lu P, Ma D, Yan C, Gong X, Du M, Shi Y (2014) Structure and mechanism of a eukaryotic transmembrane ascorbate-dependent oxidoreductase. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(5):1813–1818. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323931111>
- Mantzouridou F, Tsimidou MZ (2008) Lycopene formation in *Blakeslea trispora*. Chemical aspects of a bioprocess. *Trends Food Sci Technol* 19(7):363–371
- Martin VJ, Pitera DJ, Withers ST, Newman JD, Keasling JD (2003) Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat Biotechnol* 21(7):796–802. <https://doi.org/10.1038/nbt833>
- Michael MR, Bausch J (2003) Summary of safety studies conducted with synthetic lycopene. *Regul Toxicol Pharmacol* 37(2):274–285
- Nagao A, Yoshikawa T (2009) Absorption and function of dietary carotenoids. *Forum Nutr* 61:55
- Rao AV, Agarwal S (2000) Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. *J Am Coll Nutr* 19(5):563–569
- Tao S, Miao L, Li Q, Dai G, Lu F, Tao L, Zhang X, Ma Y (2014) Production of lycopene by metabolically-engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett* 36(7):1515–1522
- van Weeghel RP, Keck W, Robillard GT (1990) Regulated high-level expression of the mannitol permease of the phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(7):2613–2617
- Wang HH, Isaacs FJ, Carr PA, Sun ZZ, Xu G, Forest CR, Church GM (2009) Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. *Nature* 460(7257):894–898
- Wu T, Ye L, Zhao D, Li S, Li Q, Zhang B, Bi C, Zhang X (2017) Membrane engineering—A novel strategy to enhance the production and accumulation of  $\beta$ -carotene in *Escherichia coli*. *Metab Eng* 43 Part A:85–91. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.07.001>
- Yoon SH, Lee YM, Kim JE, Lee SH, Lee JH, Kim JY, Jung KH, Shin YC, Keasling JD, Kim SW (2006) Enhanced lycopene production in *Escherichia coli* engineered to synthesize isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate from mevalonate. *Biotechnol Bioeng* 94(6):1025–1032
- Yoon SH, Park HM, Kim JE, Lee SH, Choi MS, Kim JY, Oh DK, Keasling JD, Kim SW (2007) Increased beta-carotene production in recombinant *Escherichia coli* harboring an engineered isoprenoid precursor pathway with mevalonate addition. *Biotechnol Prog* 23(3):599–605. <https://doi.org/10.1021/bp070012p>
- Yoon SH, Lee SH, Das A, Ryu HK, Jang HJ, Kim JY, Oh DK, Keasling JD, Kim SW (2009) Combinatorial expression of bacterial whole mevalonate pathway for the production of beta-carotene in



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **85489** (13) **C2**  
 (51) МПК (2009)  
 C12N 1/14  
 C12P 23/00  
 C12N 15/01  
 C12R 1/645 (2008.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
 І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
 ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
 ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) МУКОРОВИЙ ГРИБ BLAKESLEA TRISPORA ШТАМ PHT 1<sup>+</sup>, PHT 1<sup>-</sup> - ПРОДУЦЕНТ ФІТОЇНУ

1

2

(21) а200714381

(22) 20.12.2007

(24) 26.01.2009

(46) 26.01.2009, Бюл.№ 2, 2009 р.

(72) СОРОКА ЯРОСЛАВ МИХАЙЛОВИЧ, УА,  
 ДМИТРЕНКО ГАЛИНА МИКОЛАЇВНА, УА,  
 СТЕНЬКО АЛЛА СТЕПАНІВНА, УА, ГОРНА  
 МАРГАРИТА СТЕПАНІВНА, УА, ТУРІАНСЬКИЙ  
 ЮРІЙ ДАВИДОВИЧ, УА, ТЮРЕНКОВ АЛЕКСЕЙ  
 АЛЕКСАНДРОВИЧ, ТЮРЕНКОВ ВЛАДІМІР  
 АЛЕКСАНДРОВИЧ, ПРАВИЛИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ  
 ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ "НАУКОВО ВИРОБНИЧЕ  
 ПІДПРИЄМСТВО "ВІТАН", УА

(56) Thomas, D.M. Goodwin, T.W. Studies on  
 carotenogenesis in *Blakeslea trispora*-l. - General  
 observations on synthesis in mated and unmated  
 strains., *Phytochemistry*, 6 (3), p.355-360, Mar 1967  
 [но-лайн], [найдено 12.11.2008]. Найдено із Інтер-  
 нет: < URL:

[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_ud](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_ud)

[i=B6TH7-42H2NX1-](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_ud)

[6&\\_user=10&\\_rdoc=1&\\_fmt=&\\_orig=search](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_ud)

[&\\_sort=d&view=c&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_useri](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_ud)

[d=10&md5](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_ud)

[=c7d1d93f8b6b05c469c361891d5ad0ce>](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_ud)

T C Lee, D B Rodriguez, I Karasawa, T H Lee, K L  
 Simpson, and C O Chichester. Chemical alteration of  
 carotene biosynthesis in *Phycomyces blakesleeanus*  
 and mutants., *Appl Microbiol*, 1975 December; 30(6):  
 988-993. PMID: PMC376580 [но-лайн], [найдено  
 12.11.2008]. Найдено із Інтернет: < URL:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?tool=pmcentrez&artid=376580&blobtype=pdf>

Daisuke Umeno, Alexander V. Tobias, and Frances  
 H. Arnold. Diversifying Carotenoid Biosynthetic  
 Pathways by Directed Evolution., *Microbiol Mol Bid  
 Rev*, 2005 March; 69(1): 51-78. doi:  
 10.1128/MMBR.69.1.51-78.2005. PMID:  
 PMC1082795 [но-лайн], [найдено 12.11.2008]. Най-  
 дено із Інтернет: < URL:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?tool=pmcentrez>

&artid=1082795&blobtype=pdf>

UA49710 A, 16.09.2002

UA2220 C1, 26.12.1994

RU 2296161 C2, 27.03.2007

Перетравність корму, обмін речовин, продуктив-  
 ність та якість м'яса курчат-бройлерів при згодову-  
 ванні біомаси гриба *Blakeslea trispora*: Автореф.  
 дис... канд. с.-г. наук: 06.02.02/ В.П. Мартиновсь-  
 кий; Нац. аграр. ун-т. - К., 2003. - 19 с. [но-лайн]  
 [найдено 12.11.2008]. Найдено із Інтернет: < URL:  
[http://www.nbu.gov.ua/\\_scripts/wwwi32.exe/%5Bin=\\_scripts/ep.in%5D](http://www.nbu.gov.ua/_scripts/wwwi32.exe/%5Bin=_scripts/ep.in%5D)

Хімічний склад препаратів каротину вітатону і ві-  
 тадепсута їх вплив на ріст і деякі показники обміну  
 речовин в організмі курей в постнатальному онто-  
 генезі: Автореф. дис. канд. біол. наук: 03.00.04 /  
 Л.О. Примова; Тавр. нац. ун-т ім. В.І.Вернадського.  
 - Сімф., 2002. - 18 с. [но-лайн] [найдено  
 12.11.2008]. Найдено із Інтернет: < URL:  
[http://www.nbu.gov.ua/\\_scripts/wwwi32.exe/%5Bin=\\_scripts/ep.in%5D](http://www.nbu.gov.ua/_scripts/wwwi32.exe/%5Bin=_scripts/ep.in%5D)

WO 92/22648 A1, 23.12.1992

WO 02/058683 A2, 01.08.2002

WO 03/041678 A1, 22.05.2003

WO 02/058682 A2, 01.08.2002

WO 00/13654 A2, 16.03.2000

Мосин О.В. Регуляция биосинтеза каротиноидов у  
 бактерий, грибов, водорослей, растений и живот-  
 ных. Журнал "Самиздат" [но-лайн], 28.08.2007  
 [найдено 12.11.2008]. Найдено із Інтернет: < URL:  
[http://web.archive.org/web/20070828194358/http://www.zhurnal.lib.ru/o/oleg\\_w\\_m/cdocumentsandsettings/olegmoidokumentyreguljacijabiosintezakarotinoidowubakterijgribowwodoroslejrasjenijizhiwotnyhrtf.shtml](http://web.archive.org/web/20070828194358/http://www.zhurnal.lib.ru/o/oleg_w_m/cdocumentsandsettings/olegmoidokumentyreguljacijabiosintezakarotinoidowubakterijgribowwodoroslejrasjenijizhiwotnyhrtf.shtml)

(57) 1. Мукоровий гриб *Blakeslea trispora* штам Pht  
 1<sup>+</sup>; Pht 1<sup>-</sup> - продуцент фітоїну, депонований в depo-  
 зитарії Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.  
 К. Заболотного НАН України за № F-100053.

2. Мукоровий гриб за п. 1 з виходом фітоїну 10-  
 15%.

3. Мукоровий гриб за п. 1 з відсутністю забарвлен-  
 ня субстратного міцелію.

(19) **UA** (11) **85489** (13) **C2**

4. Мукоровий гриб за п. 1 з інтенсивним нестатевим споруванням.

5. Мукоровий гриб за п. 1 з наявністю білої зони без зигоспорування при сумісному вирощуванні на чашці.

Винахід відноситься до біотехнології, а саме, одержання природного каротиноїду фітоїну шляхом мікробіологічного синтезу, який може бути використаний у медицині, харчовій та косметичній індустріях.

Фітоїн - природний каротиноїд з вираженою біотехнологічною активністю, має набір багатьох цінних якостей значний фармацевтичний потенціал (лікування та профілактика хвороб дихальних шляхів, шлунково-кишкового тракту, серцево-судинної системи, зору; має антиоксидантні, фотозахисні та антиканцерогенні властивості), а також широке застосування в харчовій та косметичній індустріях. Зокрема, в косметичній індустрії йому відводиться роль фактора попереджувального глибокого проникнення УФ променів в шкіру, опіків шкіри, сприяє омолодженню шкіри [1-4].

Фітоїн (7, 8, 11, 12, 7', 8', 11', 12'-октагідро- $\gamma$ - $\gamma$ -каротин) - безбарвний каротиноїд має ациклічний ізопrenoїдний ланцюг  $C_{40}H_{56}$ . Він є попередником біосинтезу лікопіну і  $\beta$ -каротину: фітоїн - фітофлуїн -  $\zeta$ -каротин - нейроспорін - лікопін -  $\beta$ -каротин. Фітоїн синтезується з двох молекул геранілгеранілпірофосфату (GGPP) за участю фітоїнсинтетази; геранілгеранілпірофосфат утворюється шляхом конверсії мевалонової кислоти або конденсацією пірувату та гліцеральдегід-3-фосфату.

Фітоїн на відміну від лікопіну і  $\beta$ -каротину стійкий до світла та окиснення, чим має певні переваги у використанні.

Фітоїн можна одержати із вищих рослин та водоростей. Серед них найбільш доступним джерелом є *Dunaliella species*.

Культивування *Dunaliella sp.* можна проводити у відкритих соляних озерах при інтенсивній інсоляції, а також в умовах вирощування в ферментерах. Вона синтезує від 1 до 30 мг/л фітоїну. Вченим Ізраїлю шляхом хімічного мутагенезу вдалось одержати білі варіанти водорості *Dunaliella sp.*; що синтезують більше фітоїну [5], але тільки в комплексі з фітофлуїном.

Здатність синтезувати каротиноїди мікроорганізмами відома, але це лише синтез комплексного набору каротиноїдів. Відомо більше 600 різних каротиноїдів і джерел їх походження та лише мала частка цих джерел може бути використана як продуцент біологічно-активних речовин.

На сьогодні невідомо продуцентів фітоїну серед мікроорганізмів.

Задача винаходу, що запропоновано - одержання штаму-продуценту фітоїну міцеліальним грибом *Blakeslea trispora*, який на сьогодні є продуцентом лікопіну і  $\beta$ -каротину.

За допомогою селекції гриба *Blakeslea trispora* з використанням дифеніламіну (5-10 мг/мл) нами одержано Pht 1<sup>+</sup> і Pht 1<sup>-</sup>.

Характеристика штаму Pht 1<sup>+</sup> і Pht 1<sup>-</sup>

Гриб *Blakeslea trispora* відноситься до мукорових грибів класу *Mucoraceae* (*Choanephora* реідентифікований у вид *Blakeslea trispora* на основі досліджень Kirka у 1984р. та описаних у визначнику "A monograph of the Choanephoraceae. Mycological paper, Kew, England, 1984, №152, p.1-61). Штам депоновано у Колекції промислових мікроорганізмів Інституту мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України під № F-100053

Морфологічні властивості

Pht 1<sup>+</sup> статева форма - добре розвинений повітряний міцелій від сірувато-білого до сірувато-жовтого кольору. Субстратний міцелій такого ж кольору, добре розвинений, щільний. Спорування слабке.

Pht 1<sup>-</sup> статева форма - повітряний міцелій розвинений, білого кольору, спорування інтенсивне нестатеве, тільки спорангіальне, представлено стилоспорангіями і спорангіями. Спорангії еліптично-шаровидні 12x16 - 10x12 мкм, триспорові, багаточисельні. Субстратний міцелій проростає в середовище, липкий і погано відділяється від агаризованого середовища.

При сумісному вирощуванні (+) і (-) статевих форм зона зигоспорування відсутня, але утворюється широка біла зона.

Фізіологічні властивості: оптимальним живильним середовищем для гриба є сусло-агар, добре росте на кукурудзяному 6-5% агарі, МПА, гірше - на середовищі Чапека. Температурний оптимум 28°C. Гриб вирощується на косяках із сусло-агаром або чашках Петрі 7-10 діб. Для зберігання культури гриба використовують ґрунт після спеціальної обробки та стерилізації. Для глибинного культивування (в колбах) використовують посівне та ферментаційне середовища наступного складу.

Посівне середовище, г/л: борошно кукурудзяне - 47,0; борошно соєве -28,0;  $KH_2PO_4$  - 0,5; вода водопровідна - 1,0л; рН=6,3-6,4.

Ферментаційне середовище, г/л: борошно кукурудзяне - 14,0; борошно соєве - 33,0; олія - 26,5; вода водопровідна - 1,0л; рН=6,3-6,4.

Середовища розливають в колби ємністю 750мл по 100мл. Стерилізацію обох середовищ здійснюють в автоклаві при 120-122°C протягом 40хв.

Штам - прототроф.

Отримання цільового продукту - фітоїну - ілюструється наступними прикладами

Приклад №1

Отримання фітоїну при вирощуванні гриба *Blakeslea trispora* Pht 1<sup>+</sup> і Pht 1<sup>-</sup> в лабораторних умовах.

На чашках Петрі при сумісному вирощуванні агарових дисків з (+) і (-) статевими формами 7-й добового віку наносять полярно і культивуються

7 діб. На зоні дотику 2-х статевих форм утворюється широка біла смуга без зигоспороутворення. З цієї зони брали наважки 5-7мг, екстрагували в гексані та визначали фітоїн за допомогою спектрофотометру.

Визначення концентрації фітоїну проводиться наступним чином: наважку 4-8мг фітоїнової біомаси переноситься у пробірку з 0,5-0,6г Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> безводного, додається 5см<sup>3</sup> гексану, ретельно розтирається біомаса скляною паличкою, пробірка закривається корковою чи поліпропіленою пробкою і залишається для екстракції в темному місці на 1 годину. Після цього повторно розтирається суспензія біомаси з сульфатом натрію безводного і перемішується на вортексі. За допомогою спектрофотометру проводяться вимірювання оптичної густини при довжині хвилі  $\lambda = 286\text{nm}$  (якщо оптична густина перевищує показник 2, то розчин розбавляється гексаном і об'єм розбавлення враховується під час розрахунку концентрації). В якості контролю використовується чистий гексан.

Обробка результату

Концентрацію (С) в % обчислюють за формулою:

$$C = \frac{D \cdot V}{m \cdot l \cdot A^{1\%}}, \text{ де:}$$

D - оптична густина розчину, що досліджується;

V - об'єм розведення, см<sup>3</sup>;

m - маса наважка зразку, г;

l - товщина кювети для вимірювання, см;

A1% - екстинкція одиниці розчину, яка для фітоїну, розчиненого в гексані, становить 915 ( $\lambda = 286\text{nm}$ ).

Паралельно визначається вологість біомаси: наважку біомаси 0,15-0,20г зважується з точністю до 5-го знаку і висушується в сушильній шафі 40-45хв. Після сушки зважується зразок і визначається вологість.

Контролем слугували такі ж наважки кожної із статевих форм, вирощених окремо. Якщо у окремо вирощеній (+) і (-) статевих форм концентрація фітоїну складала 0,35-0,38%, то при сумісному вирощуванні концентрація складала від 6 до 11-15%. Тобто при спільному вирощуванні концент-

рація фітоїну в 30 разів вища, ніж окремо взятих форм.

Спектр поглинання фітоїну в наших дослідженнях порівнювали з даними, представленими Г. Бріттоном та ін.

Спектри фітоїну отримані при скануванні екстрактів з біомаси штаму Pht 1 на спектрофотометрі Helios  $\gamma$ ,  $\lambda_{\text{max}}$ : 276; 286; 297 (а) і спектр представлений Г. Бріттоном та ін. [6] (Fig.2).

Приклад №2

Отримання фітоїну при вирощуванні Pht 1(+) і Pht 1(-) в колбах на качалках. Споровміцільною суспензією, яку змивали із косяків 7-добового росту, засівали маточні колби з посівним середовищем, що наведені вище. Вирощування продовжується на качалках при 180-200об/хв і  $t^{\circ}=28^{\circ}\text{C}$ . Визначали накопичення біомаси. Засівали в колби із ферментаційним середовищем в різних співвідношеннях статевих форм (+) і (-) - 1:1,5; 1:3; 1:5; 1:7 відповідно і культивували від 3 до 7 діб.

Концентрація фітоїну залежала від співвідношення двох статевих форм та тривалості ферментації. Оптимальними виявились співвідношення 1:5 при 7-добовій ферментації. Вихід фітоїну складав від 1,5 до 2,2г/л культуральної рідини або концентрації 10-15%.

Джерела інформації

1. Villadsen I. A method of generating high carotenoid-producing microorganisms, microorganisms obtained by the method and a process for producing carotenoid containing cells or cell parts or purified carotenoid. WO 92/22648, 1992.

2. Harris A., Zelkha M., Paran E. Carotenoids as anti-hypertension agents. WO 02/058683 A2. 2002.

3. Zelkha M., Nir Z., Sedlov T. Carotenoid compositium and method for protection skin. WO 03/041678 A1. 2002.

4. Zelkha M., Sedlov T., Nir L., An anti-atherosclerosis compositium containing carotenoids and method for inhibiting Ldl oxidation. WO 02/058682 A2. 2002

5. Sondant E., Schickler H. et al. A carotenoid preparation. WO 00/13654. 2000.

6. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. Carotenoids. - Basel: Birkhaeser Verlag, 329p. - 2004.

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 93055829/13, 15.12.1993

(46) Дата публикации: 27.01.1996

(56) Ссылки: 1. Авторское свидетельство СССР N 260825, кл. С 12P 23/00, 1970. 2. Патент Франции N 1456569, кл. С 12P 23/00, 1981. 3. Патент Франции N 1449879, кл. С 12P 23/00, 1987. 4. Патент США N 2890989, кл. С 12P 23/00, 1987.

(71) Заявитель:

Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов,  
Акционерное общество открытого типа  
"Уралбиофарм"

(72) Изобретатель: Морозова Е.С.,  
Васильченко Л.Г., Рязанова Е.М., Киселева А.И.,  
Панова Н.А., Воронова Н.В.

(73) Патентообладатель:

Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов,  
Акционерное общество открытого типа  
"Уралбиофарм"

(54) ПАРА ШТАММОВ ГЕТЕРОТАЛЛИЧНОГО ГРИБА BLAKESLEA TRISPOGA F - 674(+) И F-551(-), ПРОДУЦИРУЮЩАЯ БЕТА-КАРОТИН

(57) Реферат:

Использование: в микробиологической промышленности. Сущность: в результате многоступенчатой селекции получена новая пара мутантных штаммов гриба *blakeslea trispora* 185Б(+) и 185Б(-), продуцирующая бета-каротин. При совместном глубинном

культивировании штаммов 185Б(+) и 185Б(-) в лабораторных условиях на питательной среде простого состава в течение 114 ч уровень накопления бета-каротина в мицелии составляет в среднем 300000 мкг/100 мл культуральной жидкости.

RU 2053301 C1

RU 2053301 C1

Изобретение относится к микробиологической промышленности и представляет собой пару (+) и (-) штаммов гриба *Blakeslea trispora*, продуцирующую бета-каротин.

Бета-каротин (провитамин А), получаемый на основе микробиологического синтеза, находит применение в ряде отраслей пищевой промышленности, фармакологии, медицине, в косметической промышленности, а также в сельском хозяйстве в качестве добавки к рациону животных и птицы.

В качестве продуцентов бета-каротина известны различные виды микроорганизмов: бактерии, актиномицеты, дрожжи, микроводоросли, а также многие виды грибов.

Наиболее активным продуцентом, используемым для промышленного получения бета-каротина, является гетероталлический гриб *Blakeslea trispora*, относящийся в порядку *Mucorales*.

Получение бета-каротина осуществляют путем совместного глубинного культивирования пары (+) и (-) штаммов продуцента на питательных средах различного состава.

В авторском свидетельстве СССР N 260825 пару штаммов *Blakeslea trispora* NRRL 2895 (+) и NRRL2896 (-) культивируют на средах, включающих измельченные кукурузу и сою, сухие дрожжи или белковый препарат из семян хлопчатника ("Pharmamedia"), цитрусовую мелассу, автоклавные масла (отход, получаемый после обезжиривания отбеленных земель, применяемых при рафинировании растительных масел), тиамин и керосин. Максимальное накопление бета-каротина в этих условиях составляет 100000 мкг/100 мл среды.

Недостатком пары штаммов NRRL 2895(+) и NRRL 2896(-) является их низкая продуктивность при культивировании на средах сложного состава с добавлением керосина, что исключает возможность использования целевого продукта в пищевых производствах.

В патентах Франции NN 1456569 и 1449879 пару штаммов *Blakeslea trispora* NRRL 2456(+) и NRRL 2457(-) культивируют на среде, содержащей крахмал, дрожжевой экстракт, соевое и хлопковое масло, керосин, тиамин и бета-ионон. В первом случае добавление к среде 0,5 г/л фурил-2-гидразина обеспечивало накопление бета-каротина в количестве 250500 мкг/100 мл, во втором внесение в среду 2 г/л формил-4-пиридина позволяло получить 306500 мкг бета-каротина/100 мл среды.

Недостаток пары штаммов NRRL 2456(+) и NRRL 2457(-) заключается в необходимости использовать в составе ферментационных сред для достижения высоких уровней синтеза бета-каротина дорогостоящие компоненты и керосин, что препятствует производству препаратов в промышленном масштабе и ограничивает сферы их применения.

Известны пары (+) и (-) штаммов *Blakeslea trispora*, способные синтезировать бета-каротин при росте на простых по составу средах, не содержащих керосин.

В патенте США N 2890989 пару штаммов *Blakeslea trispora* NRRL 1348(+) и NRRL 2457(-) культивируют на среде с

негидролизованной размельченной кукурузой (5%) и соевой мукой (5%), растительными маслами (4%), тиамином и поверхностно-активным веществом.

5 Стимулятор синтеза бета-каротина бета-ионон добавляют через 48 ч совместного роста культур. В описанных условиях при продолжительности ферментации 144 ч пара штаммов NRRL 1348(+) и NRRL 2457(-) обеспечивает накопление каротина в количестве 51600 мкг/100 мл среды. 10 Недостатком данной пары штаммов является их низкая продуктивность.

По совокупности признаков (вид продуцента, состав ферментационной среды, техника ее приготовления) пара штаммов 15 *Blakeslea trispora* NRRL 1348(+) и NRRL 2457(-) [4] выбрана в качестве прототипа.

Нашей задачей является создание новой пары (+) и (-) штаммов гетероталлического гриба *Blakeslea trispora*, обеспечивающей 20 высокий уровень биосинтеза бета-каротина при совместном росте на простой по составу среде, не содержащей керосин и дорогостоящие компоненты.

Получена пара штаммов *Blakeslea trispora* 25 1855(+) и 1855(-), которая при совместном культивировании в течение 114 ч на ферментационной среде, содержащей в качестве основных компонентов негидролизованные соевую и кукурузную муку, растительное масло, тиамин, антиокислитель и бета-ионон, обеспечивает в лабораторных условиях средний уровень 30 накопления бета-каротина, равный 300000 мкг/100 мл культуральной жидкости.

30 Штаммы *Blakeslea trispora* 1855(+) и 1855(-) получены из (+) и (-) форм коллекционного штамма *B. trispora* в результате многоступенчатой селекции с применением ультрафиолетовых лучей, азотистой кислоты и 35 N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина в качестве мутагенных факторов.

Штаммы *Blakeslea trispora* 1855(+) и 40 1855(-) депонированы во Всесоюзной коллекции промышленных микроорганизмов института "ВНИИгенетика" под номерами ВКПМ F-674 и ВКПМ F-551 соответственно.

Штаммы 1855(+) и 1855(-) имеют 45 следующие морфологические характеристики: Сусло-агар

1855(+) Рост интенсивный. Воздушный мицелий развит равномерно, пушистый, 50 палевого цвета. Спорообразование среднее.

1855(-) Рост более медленный, чем у 1855(+), Воздушный мицелий стелющийся или слабо пушистый, бледно-оранжевого цвета. Спорообразование скудное.

Среда Роулен-Тома с добавлением кукурузного экстракта.

Рост обоих (+) и (-) штаммов слабый. 55 Воздушный мицелий серый паутиннообразный, стелющийся. Спорообразование очень скудное.

Среда GAT для *Blakeslea* с глюкозой, аспарагином и тиамином (*Phytochemistry*, 1967, v. 6, N3, p. 355).

60 Рост обоих (+) и (-) штаммов слабый, замедленный. Воздушный мицелий белый, слегка приподнимающийся. Субстратный мицелий развит неравномерно, имеет оранжевую окраску. Спорообразование слабое.

Среда Роулен-Тома с сахарозой.

Оба (+) и (-) штамма образуют высокий, пушистый, воздушный мицелий белого цвета. Субстратный мицелий желтый. Спор практически не образует.

Совместный рост (+) и (-) штаммов на сусло-агаре.

При совместном росте в месте соприкосновения колоний наблюдается образование широкой, четко выраженной полосы кирпично-красного мицелия, на котором в небольшом количестве формируются черные зигоспоры.

Оптимальная температура роста штаммов 185Б(+) и 185Б(-) 26-28°C.

При совместном глубинном культивировании штаммов 185Б(+) и 185Б(-) в лабораторных условиях на ферментационной среде с соевой и кукурузной мукой, растительным маслом, тиамином, антиокислителем и бета-иононом при 28°C накопление бета-каротина через 114 ч роста культур в среднем составляет 300000 мкг/100 мл культуральной жидкости.

Штаммы 185Б(+) и 185Б(-) в течение 2 лет стабильно сохраняют свои морфологические признаки и уровень биосинтетической активности.

Штаммы 185Б(+) и 185Б(-) непатогенны.

Пример 1. Для получения вегетативного посевного материала штаммы 185Б(+) и 185Б(-) выращивают отдельно на жидкой посевной среде, имеющей состав, г: Соевая мука 4,7 Кукурузная мука 2,3  $\text{KN}_2\text{PO}_4$  0,05 Тиамин 0,0002 Вода водопроводная до 100 мл.

Соевую и кукурузную муку перед приготовлением среды подвергают частичному гидролизу серной кислотой в автоклаве при 120°C в течение 1,5 ч. Перед стерилизацией pH среды доводят до 6,9 с помощью раствора NaOH.

Культивирование проводят в колбах Эрленмейера объемом 750 мл, содержащих для (+) штамма 100 мл, а для (-) штамма 150 мл среды. Засев посевных колб осуществляют водной суспензией спор 7-10-дневных культур на скошенном сусло-агаре в количестве 0,1-0,15 мл (+) штамма и 1,0-1,5 мл (-) штамма, Инкубацию проводят в течение 44 ч при 28 °C на круговых качалках, вращающихся со скоростью 240 об/мин.

Процесс ферментации осуществляют путем совместного культивирования (+) и (-) штаммов на питательной среде следующего

состава, г: Соевая мука 4,0 Кукурузная мука 1,73  $\text{KN}_2\text{PO}_4$  0,05 Тиамин 0,0002 Вода водопроводная до 100 мл. pH среды 6,1-6,2 (натуральный).

5 Приготовленную среду в количестве 50 мл помещают в колбы Эрленмейера объемом 750 мл, после чего в каждую колбу перед стерилизацией добавляют по 3 мл растительного масла. pH среды после стерилизации натуральный.

10 Посевной мицелий (+) и (-) штаммов в общем количестве 20% вносят в колбы с 50 мл ферментационной среды в соотношении 1:4 соответственно. Инкубацию проводят на круговых качалках со скоростью вращения 240 об/мин при 28°C.

15 Через 42 ч роста в культуральную жидкость добавляют антиокислитель (0,01%) и бета-ионон (0,15%). Продолжительность ферментации 114 ч.

20 По окончании ферментации содержимое нескольких колб объединяют. Для определения количества синтезированного бета-каротина используют мицелий, содержащийся в 100 мл смешанной культуральной жидкости. Определение осуществляют по следующей методике. 100

25 мл культуральной жидкости прогревают на водяной бане при 85-100°C в течение 15 мин, охлаждают и фильтруют. Бета-каротин, содержащийся в пробе полученной биомассы, экстрагируют ацетоном. Интенсивность окраски полученного раствора измеряют на фотозлектрокалориметре при длине волны 440 нм. Содержание (уровень накопления) бета-каротина выражают в мкг/100 мл культуральной жидкости.

30 Ниже приведены накопления бета-каротина при совместном культивировании штаммов 185Б(+) и 185Б(-) (см. таблицу).

35 Таким образом, полученная новая пара штаммов *Blakeslea trispora* 185Б(+) и 185Б(-) по сравнению с прототипом при культивировании на близкой по компонентному составу и способу приготовления среде обеспечивает более

40 высокий уровень биосинтеза бета-каротина, составляющий в среднем 300000 мкг/100 мл и максимально 334000 мкг/100 мл культуральной жидкости.

**Формула изобретения:**

Пара штаммов гетероталличного гриба *Blakeslea trispora* F-674(+) и F-551(-), продуцирующая бета-каротин.

50

55

60