

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»

Директор інституту(декан факультету)

Наталія ГРЕГІРЧАК

(підпис)

(прізвище та ініціали)

« » _____ 2024 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Віктор СТАБНІКОВ

(підпис)

(прізвище та ініціали)

« » _____ 2024 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Промислова та фармацевтична біотехнологія»

на тему: Досягнення біотехнології для одержання харчових добавок

Виконав: здобувач II курсу, групи 1

ТКАЧЕНКО Уляна Михайлівна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник ПИРОГ Тетяна Павлівна

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти _____

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Рецензент

Тетяна ЗАДОРЖНИХ

(ім'я та прізвище)

(підпис)

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

Здобувач _____

(підпис)

Київ – 2024 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

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

Освітньо-професійна програма «Промислова та фармацевтична біотехнологія»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“__” _____ 202_ року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ТКАЧЕНКО Уляни Михайлівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Досягнення біотехнології для одержання харчових добавок
керівник роботи ПИРОГ Тетяна Павлівна, д. б. н., проф.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 7 жовтня 2024 року № 875-кв _

2. Строк подання здобувачем роботи 07.10.2024

3. Вихідні дані до роботи цільовий продукт: аскорбінова кислота

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)
Виробництво аскорбінової кислоти за участі мікроорганізмів. Техніко-економічне обґрунтування випуску субстанції для лікарського засобу та виробництва готової форми. Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу субстанції та технологічної схеми виробництва аскорбінової кислоти. Опис технологічного процесу біосинтезу. Опис технологічного процесу виділення і очищення субстанції для виробництва аскорбінової кислоти. Опис технологічного процесу виробництва лікарського засобу.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва – 1 аркуш формату А3; апаратурна схема виробництва – 1 аркуш формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 08 жовтня 2024 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	<i>Огляд літератури на тему досягнення біотехнології для одержання харчових добавок</i>	08.10.24-20.10.24	
2	<i>Обґрунтування вибору біологічного агента</i>	20.10.24-23.10.24	
3	<i>Техніко-економічне обґрунтування аскорбінової кислоти як харчової добавки</i>	23.10.24-30.10.24	
4	<i>Обґрунтування етапів виділення та очищення субстанції</i>	30.10.24-07.11.24	
5	<i>Контроль виробництва субстанції</i>	07.11.24-08.11.24	
6	<i>Опис технологічної схеми</i>	08.11.24-14.11.24	
7	<i>Виконання графічної частини роботи</i>	14.11.24-24.11.24	

Здобувач _____
(підпис)

Керівник роботи _____
(підпис)

Уляна ТКАЧЕНКО
(ім'я та прізвище)

Тетяна ПИРОГ
(ім'я та прізвище)

ABSTRACT

The qualification work concerns the technology of post-fermentation extraction and purification of ascorbic acid after the cultivation of *Aspergillus tamarii* (strain not specified). Ascorbic acid is widely used in the baking industry. The addition of ascorbic acid improves the structural and mechanical properties of the dough, its gas retention and shaping ability, resulting in increased bread volume, improved crumb structure, and reduced spreading of baked goods. Overdosing with ascorbic acid does not lead to a deterioration in product quality. As of 2024, the food market in Ukraine is very diverse, thus a target group comprising 1% of the total population has been selected for supply. The annual requirement for ascorbic acid as a food additive for bread production amounts to 491.9 kg. Considering a 30% loss during extraction and purification, a labor input of 60 man-days, and a filling coefficient of 0.6, the volume of the fermenter is 5 m³.

The technology for obtaining ascorbic acid includes filtering the culture liquid, extracting ascorbic acid from the filtrate, crystallizing ascorbic acid, collecting it through filtration, and lyophilizing the obtained crystalline substance. The appearance, solubility, pH value, specific optical rotation of ascorbic acid are determined, qualitative reactions are performed, and quantitative content is assessed.

The qualification work consists of 10 chapters, 159 references, 12 figures, 13 tables, and is presented on 134 pages. The graphical part includes technological diagrams (1 drawing in A3 format) and equipment schemes (1 drawing in A1 format).

Keywords: ascorbic acid, *Aspergillus tamarii*, baking industry, food, filtration, crystallizer, lyophilization, quantitative determination.

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота стосується технології післяферментаційного виділення та очищення субстанції аскорбінової кислоти після культивування *Aspergillus tamarii* (штам не вказано). Аскорбінова кислота широко використовується в хлібопекарській промисловості. При внесенні аскорбінової кислоти покращуються структурно-механічні властивості тіста, його газо- і формоутримувальна здатність, унаслідок чого збільшується об'єм хліба, покращується структура м'якушки, зменшується розпливання подових виробів. Передозування аскорбінової кислоти не приводить до погіршення якості виробів. Ринок харчових продуктів станом на 2024 рік в Україні дуже різноманітний, тому для забезпечення обрано цільову групу 1% загальної чисельності населення. Річна потреба в аскорбіновій кислоті як харчової добавки для виробництва хліба складає 491,9 кг. При врахуванні 30% втрат при виділенні та очищенні, кількості трудоднів 137 та коефіцієнті заповнення 0,6 об'єм ферментера становить 5 м³.

Технологія отримання аскорбінової кислоти включає фільтрування культуральної рідини, екстракцію аскорбінової кислоти з фільтрату, кристалізацію аскорбінової кислоти, збирання фільтруванням та ліофілізаційне висушування отриманої кристалічної субстанції.

Визначають зовнішній вигляд, розчинність, значення рН, питоме оптичне обертання аскорбінової кислоти, проводять якісні реакції та визначають кількісний вміст.

Кваліфікаційна робота містить 10 розділів, 159 літературних джерел, 12 рисунки, 13 таблиці та викладена на 134 сторінках. Графічна частина представлена технологічною (1 креслення формату А3) та апаратурною схемами (1 креслення формату А1).

Ключові слова: аскорбінова кислота, *Aspergillus tamarii*, хлібопекарська промисловість, харчування, фільтрування, кристалізатор, ліофілізація, кількісне визначення.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	3
ВСТУП.....	8
ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	
РОЗДІЛ 1. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ХАРЧОВИХ ДОБАВОК ТА ЇХ КЛАСИФІКАЦІЯ	10
РОЗДІЛ 2. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ПІДХОДИ ОДЕРЖАННЯ ХАРЧОВИХ ДОБАВОК	18
2.1. Антиоксиданти і регулятори кислотності.....	18
2.2. Барвники.....	26
2.3. Вологоутримувальні агенти.....	33
2.4. Загусники, стабілізатори та емульгатори.....	40
2.5. Консерванти.....	46
2.6. Підсилювачі смаку та аромату.....	51
2.7. Підсолоджувачі.....	57
ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА	
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ ЯК ХАРЧОВОЇ ДОБАВКИ.....	65
3.1. Аналіз властивостей аскорбінової кислоти, галузей використання, потреби у харчовій добавці.....	65
3.2. Розрахунок потреби у субстанції та розрахунок річної потреби у культуральній рідині для одержання розрахованої кількості субстанції.....	68
РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТУ ...	73
4.1. Обґрунтування вибору біологічного агенту.....	73
РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ОТРИМАННЯ СУБСТАНЦІЇ АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ.....	79
5.1. Відділення біомаси.....	80
5.2. Екстракція аскорбінової кислоти.....	82
5.3. Кристалізація аскорбінової кислоти.....	83
5.4. Збирання кристалів.....	87
5.5. Висушування кристалів.....	92
5.6. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків	

по стадіях.....	94
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	97
6.1. Специфікація обладнання для отримання субстанції аскорбінової кислоти.....	97
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОТРИМАННЯ СУБСТАНЦІЇ АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ.....	100
РОЗДІЛ 8. ТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ ГОТОВОЇ КІНЦЕВОЇ ФОРМИ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	103
8.1. Обґрунтування вибору товарної форми випуску цільового продукту мікробного синтезу (форми випуску продукту та вибір упаковки).....	103
8.2. Вибір форми випуску аскорбінової кислоти.....	104
8.3 Вибір упаковки.....	105
8.4 Обладнання яке може використовуватись для фасування аскорбінової кислоти(E300).....	105
8.5. Класи чистоти.....	106
РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ.....	110
ВИСНОВКИ.....	114
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	115

ВСТУП

Роль промислової харчової біотехнології в харчовій промисловості має широкий спектр технологій, які використовуються для переробки харчових продуктів у всьому світі, особливо в країнах, що розвиваються. Серед таких технологій можна назвати дегідратацію, фарбування, заморожування, консервування, вакуумне пакування, кристалізацію цукру, виробництво ферментів, пробіотиків і осмодегідратацію. Харчова біотехнологія забезпечує вищий рівень використання ресурсів і зменшує забруднення навколишнього середовища завдяки обробці відходів харчової промисловості шляхом ферментації та біологічної інженерії (Awulachew, 2021).

Переробка харчових продуктів як аспект біотехнології спрямована на відбір і вдосконалення цільових продуцентів. Використовуються різноманітні біотехнологічні інструменти та технології для перетворення сировинних інгредієнтів або неїстівних харчових матеріалів у більш поживні та сприятливі до вживання харчові продукти, що характеризуються високим ступенем користі та стабільності з тривалим терміном зберігання. Завдяки використанню сучасних біотехнологій у харчовій промисловості стало можливим не тільки зменшити втрати харчових продуктів, але й покращити їх якість (Awulachew, 2021).

					НУХТ БТЕК 02.01.22 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата				
Розробник	Ткаченко У.М.				ВСТУП	Літера	Аркуш	Аркушів
Керівник	Пирог Т.П.						8	2
Н. контр								8
Консульт						Кафедра БТМ		
Зав. Каф.	Стабніков В.П.							

Харчові добавки стали дуже поширеними і актуальними в розрізі сучасної харчової промисловості. Готова до споживання їжа, доступна на ринку, часто може містити певного роду добавки, так що їхня якість щодо зовнішнього вигляду, текстури, смаку та смакових властивостей регулюється та гарантується. Виробництво більшості низькокалорійних снєків і готових до вживання напівфабрикатів було б неможливим без використання харчових добавок. Швидке зростання населення та дедалі більші зміни в харчових уподобаннях і смаках підвищили попит на якісну їжу та продовжуватимуть впливати на попит на поживні та здорові продукти харчування. Це надалі спонукатиме до необхідності більш широкого використання харчових добавок та впровадження нових підходів у пошуку та синтезі харчових добавок (Mwale, 2023).

Таким чином, актуальним є пошук мікроорганізмів-продуцентів та дослідження виробництва харчових добавок шляхом мікробіологічного синтезу, що дозволить розширити ринок харчових добавок, урізноманітнити їх асортимент, що відкриє нові шляхи для виробництва удосконалених харчових продуктів та сприятливо вплине на задоволення потреб суспільства по всьому світі.

РОЗДІЛ 1. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ХАРЧОВИХ ДОБАВОК ТА ЇХ КЛАСИФІКАЦІЯ

Харчові добавки включають широкий спектр функціональних категорій, таких як антиоксиданти, загусники, стабілізатори та емульгатори, ароматизатори, підсолоджувачі, харчові добавки та барвники, і в найширшому розумінні визначаються як речовини, що призначені для додавання до харчових продуктів або харчових інгредієнтів для збереження аромату, покращення смаку та/або зміни зовнішнього вигляду (Sun, Xin & Alper, 2021).

Наступний клас добавок – барвників – визначено Управлінням з харчових продуктів і медикаментів США (FDA) як «будь-який барвник, пігмент або речовина, яка при додаванні або нанесенні на їжу, ліки, косметику або на тіло людини здатні (самостійно або через реакції з іншими речовинами) надавати колір». Барвники є критично важливими компонентами, які підвищують безпечність, якість і зовнішній вигляд харчових продуктів протягом усього життєвого циклу від обробки до споживання. Хоча всі ці молекули спільно оцінюються спільним комітетом експертів ФАО/ВООЗ з харчових добавок (JECFA), конкретні правила та норми відрізняються в різних країнах. Як приклад, понад 3000 харчових добавок і барвників можна знайти в списку EAFUS (Усе, що додається до їжі в Сполучених Штатах) FDA, понад 2000 харчових добавок і барвників позначаються відповідно до китайської системи чисел (CNS) і національного стандарту безпеки харчових продуктів для використання харчових добавок, і лише 402 речовини внесено до каталогу з інвентарним номером Європейського Союзу (номер «Е»), затвердженого Європейським органом з безпеки харчових продуктів (EFSA).

					НУХТ БТЕК 02.01.22 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. Загальна характеристика харчових добавок	Літера	Аркуш	Аркушів
Розробник	Ткаченко У.М.						10	8
Керівник	Пирог Т.П.							10
Н. контр						Кафедра БТМ		
Консульт								
Зав. Каф.	Стабніков В.П.							

За останні кілька десятиліть прогрес у синтетичній біології та біотехнології загалом призвів до появи багатьох компаній, які виробляють харчові добавки та інгредієнти на біологічній основі. Насправді серед десяти найбільш фінансованих стартапів в першій половині 2020 року чотири з цих компаній зосереджені на харчових біотехнологіях, включаючи Impossible Foods, Apeel Sciences, Memphis Meats і Nature's Fynd. Усі ці компанії займаються виробництвом біотехнологічних добавок та харчових замінників для виробництва та покращення продуктів харчування (Sun, Xin & Alper, 2021).

Так, одна з найбільш швидкозростаючих компаній, Impossible Foods, виробляє рослинні альтернативи м'ясу зі смаком, текстурою та кольором, схожими на м'ясо тварин, використовуючи біоінженерний гем і соєвий білок. Додаткові компанії також виходять на цей простір. Наприклад, Endless West – це стартап із виробництва напоїв, який виробляє такі продукти, як штучний віскі, безпосередньо шляхом змішування харчового алкоголю з молекулами смако-ароматичних добавок, отриманих з дріжджів. Інші компанії-початківці, такі як Perfect Day і Clara Foods, розробили технології для створення молочних білків, включаючи казеїн, сироватку та яєчний білок, шляхом ферментації для використання в якості харчових інгредієнтів.

Прогнозується, що глобальний ринок біотехнології в харчовій сфері досягне 2575,2 млн доларів США до кінця 2024 року. Для покриття такої значної потреби в харчових добавках слід посилити та прискорити розробку та індустріалізацію підприємств мікробного синтезу для екологічно безпечного виробництва харчових добавок і барвників (Sun, Xin & Alper, 2021).

Барвники

Барвники – це вид харчових добавок, які додають до їжі, щоб відновити колір, втрачений під час приготування, покращити сприйняття смаку або зробити їжу більш привабливо. Барвники присутні як у натуральних, так і в синтетичних формах, причому природні харчові барвники отримують з джерел рослинного, тваринного або мікробного чи мінерального походження (Wu et al., 2021; Liu et al., 2022).

Наприклад, куркумін в основному використовується для фарбування харчових продуктів, таких як напої, соуси та кондитерські вироби, гранична його концентрація становить не більше 0,01 г/кг. Крім того, кантаксантин, який використовується для виробництва харчових добавок для засмаги, цукерок і газованих напоїв, має максимальне дозування від 0,001 до 0,03 г/кг. З іншого боку, синтетичні харчові барвники також відомі як штучні харчові барвники, виробляються хімічним шляхом. При цьому хіноліновий жовтий, який використовується для фарбування холодних фруктів, морозива, солодошів і напоїв, повинен контролюватись у харчовій промисловості до 0,1 г/кг. Тартразин в основному додається в супи, морозиво, солодоші, жувальні гумки та йогурт, має максимальну дозу від 0,015 до 0,018 г/кг (Wu et al., 2021; Liu et al., 2022).

Консерванти

Консерванти використовуються для запобігання псуванню харчових продуктів через зараження грибками, бактеріями та іншими мікроорганізмами з метою збереження безпечних харчових продуктів протягом тривалого часу. Як і харчові барвники, консерванти також можна розділити на дві основні групи: штучні та натуральні. Штучні консерванти, які зазвичай використовуються, включають сорбінову кислоту, яка використовується в молочних продуктах, соєвих продуктах, оброблених овочах, варених м'ясних продуктах і морепродуктах. Максимальна доза сорбінової кислоти становить від 0,075 до 2,0 г/кг при переробці харчових продуктів. Бензойна кислота та її солі зазвичай використовуються для консервування приправ, маринованих продуктів, напоїв і фруктових вин – максимальна доза від 0,2 до 2,0 г/кг. Природні консерванти, включаючи нізін, додають до м'яса, молочних продуктів, продуктів рослинного білка, консервів, кавових напоїв, чаю та соєвого соусу. Максимальна кількість додавання низину становить 0,15-0,5 г/кг. Крім того, максимальна доза натаміцину повинна бути нижче 0,1 г/кг при переробці харчових продуктів (Wu et al., 2021; Liu et al., 2022).

Антиоксиданти

Між консервантами та антиоксидантами існує певний збіг, оскільки вони мають однаковий вплив на покращення збереження харчових продуктів.

Антиоксиданти в основному запобігають або гальмують процес окислення, щоб зберегти харчові продукти від псування. Природні антиоксидантні добавки зазвичай додають до м'яса, риби, горіхів, овочів, фруктів, напоїв і консервів. Наприклад, додавання аскорбінової кислоти, а також її солеподібного аскорбату та її геометричних ізомерів слід контролювати в діапазоні від 0,2 до 5,0 г/кг. Штучні антиоксиданти часто додають до олій, сиру та чіпсів, щоб уникнути утворення гідропероксидів. Наприклад, фенольні похідні пропілгаллату слід контролювати в дозуванні від 0,1 до 0,4 г/кг. Крім того, трет-бутилгідрохінон має максимальне дозування 0,2 г/кг, а вміст бутилгідроксіанізола має становити не більше 0,2 г/кг (Wu et al., 2021; Liu et al., 2022).

Підсолоджувачі

Підсолоджувачі, замітники цукру — це харчові добавки, що забезпечують солодкий смак, схожий на смак цукру, водночас містять значно менше харчової енергії, що характеризує їх як безкалорійні або низькокалорійні продукти. Натуральні підсолоджувачі, такі як сорбіт, ксиліт і маніт, отримують із цукрів, які широко використовуються в молочних продуктах, чаї, алкогольних напоях, приправах, цукерках, крохмальних продуктах, оброблених фруктах і овочах. При цьому максимальна доза сорбіту становить від 0,5 до 3,0 г/кг; додаткову кількість маніту слід контролювати не вище 0,2 г/кг. Штучні підсолоджувачі, такі як аспартам, циклакат, сахарин натрію та сукралоза, в основному використовуються у фруктах, джемах, напоях, десертах та молочних продуктах. Максимальна доза аспартама становить від 0,3 до 4,0 г/кг; циклакат має максимальне дозування від 0,65 до 8,0; а сахарин натрію - від 0,15 до 5,0 г/кг (Wu et al., 2021; Liu et al., 2022).

Емульгатори, стабілізатори, загусники та гелеутворювачі

Оскільки більшість харчових добавок мають подібні функції, загусники та гелеутворювачі володіють спектром подібних властивостей. Тому емульгатори, стабілізатори, загусники та гелеутворювачі класифікуються як одна група від E400 до E499 у класифікації номерів E. Емульгатори, також звані емульгентами, виконують функції межі між конфліктуєчими компонентами у воді та олії та використовуються в кремах і соусах, хлібобулочних і молочних продуктах.

Прикладами емульгаторів є ефіри полігліцерину, які мають максимальний діапазон дозування від 5 до 10 г/кг. Стабілізатори - це речовини, які дозволяють харчовим інгредієнтам, які погано змішуються, залишатися в однорідному стані після змішування. Харчові стабілізатори представлені агаром, альгіновою кислотою та її натрієвою, калієвою, амонійною та кальцієвою солями. Загусники - це речовини, які додають до харчових продуктів для підвищення їх в'язкості без зміни інших властивостей, таких як смак, наприклад, максимальна доза пектину становить менше 3,0 г/кг. Гелеутворювачі, такі як конжак, камедь карайя та гелланова камедь, додаються до харчових продуктів для отримання специфічної структури, текучості, стабільності та харчових якостей, бажаних для споживачів (Wu et al., 2021; Liu et al., 2022).

Глазурувальні агенти, підсилювачі смаку

Інші добавки, такі як глазурувальні агенти, мають інші функції для покращення збивання, розпушування та стійкості кольору. Прикладом таких речовин є шелак – має максимальний діапазон дозування нижче 0,2 г/кг у харчовій промисловості. Крім того, харчові підсилювачі смаку, такі як глутамат натрію та гуанілова кислота, функціонують у напрямку посилення смаку, причому глутамат натрію має максимальну дозу від 0,2 до 0,5 г/кг, а вміст гуанілової кислоти має бути нижчим за 0,5 г/кг.

Отже, харчові добавки інтенсивно використовуються і виконують функції поліпшення якості харчових продуктів. Однак переважна більшість випадків безпеки харчових продуктів, спричинених незаконною діяльністю, особливо зловживанням і незаконним використанням харчових добавок, викликають занепокоєння громадськості в усьому світі. Таким чином, регулювання використання та дозування харчових добавок є найбільш ефективним методом стандартизації ринкових взаємодій та підвищення рівня безпеки харчових продуктів (Wu et al., 2021; Liu et al., 2022).

В табл. 1.1 представлено узагальнені дані щодо класифікації продуктів мікробного синтезу як харчових добавок та відповідних їм Е-номерів.

Продукти мікробного синтезу як харчові добавки

Класи харчових добавок (діапазон Е-чисел)	Піддіапазон Е-чисел	Характеристика	Відповідний продукт мікробного синтезу/ Е-номер
100-199 Харчові барвники	100-109	Жовті	Рибофлавін (E101)
	160-199	Золоті та інші	Каротин (E160a)
			Лікопін (E160d)
			Астаксантин (E161j)
200-299 Консерванти, антиокислювачі	200- 240	Феноли і форміати та інші	Нізін E234 Натаміцин E235
	241-269	Ацетати та інші	Оцтова кислота E260
	270-299	Лактати (солі молочної кислоти) та інші	Молочна кислота E270
			Е 280 – Пропіонова кислота
300-399 Антиоксиданти і регулятори кислотності	300-329	Аскорбати (Вітамін С) та інші	Аскорбінова кислота(E300)
			Е 325 – Лактат натрію
			Е 327 – Лактат кальцію
	330-359	Цитрати і тартрати (солі лимонної та винної кислот) та інші	Лимонна кислота E330
	360-399	Сукцинати і фумарати (солі бурштинової та фумарової кислот) і інші	Бурштинова кислота (E363)
			Е 375 – Нікотинава кислота
400-499 Загусники, стабілізатори Емульгатори та	400-409	Альгінати (солі альгінової кислоти)	Альгінат натрію (E401)
	410-419	Природні камеді	Ксантанова камедь (E415)
	420-499	Інші природні агенти та сполуки	Сорбітол (сорбіт, E420)
			Манітол (маніт, E421)
Курдлан (E424)			
500-599 рН Регулятори та агенти, що запобігають злипанню	500-599	Стеарати і глюконати (солі стеаринової та глюконової кислот) та інше	Глюконова кислота E574
600-699 Підсилювачі смаку і аромату	620-629	Глутамати і гуанілати (солі глутамінової кислоти та гуанозинмонофосфату) та інші	Глутамат натрію (моонатрієва сіль глутамінової кислоти, E621)
	640-649		Лізін гідрохлорид (E642)

Продовження таблиці 1.1.

900-999 Різне (Miscellaneous)	900-999	Замінники цукру/підсолоджувачі та інші	Ксилітол (E967)
			Еритол (E968)
1000–1521 – вологоутримувальні агенти	1000-1521		Пулулан (E1024)
			E 1100 – Амілази
			E 1101- Протеаза
			E1102- Глюкозооксидаза
			E 1103 – Інвертази
			E 1105 – Лізоцим
			E 1510 – Спирт етиловий
Бутилбутират	Ароматизатори	має фруктовий смак, широко використовується у виробництві напоїв і ароматів	Е-номер не надано
Лімонен	Ароматизатори	має смак цитрусових, таких як апельсин і лимон, і широко використовується в харчовій промисловості та виробництві напоїв	Е-номер не надано
Ванілін	Ароматизатори	ароматична суміш, отримана з висушених насінневих стручків ванільної орхідеї <i>Vanilla planifolia</i>	Е-номер не надано
Гумулон	Ароматизатори	ароматичною сполукою хмелю, гіркий смак і аромат пива.	Е-номер не надано
Таурин	Ароматизатори	сірковмісна амінокислота, яка міститься в тканинах тварин. Таурин є однією зі смакових сполук м'ясних продуктів	Е-номер не надано

Закінчення таблиці 1.1.

2-фенілетанол	Ароматизатори	м'який квітковий аромат, при приготуванні багатьох квіткових парфумерних композицій (парфуми, одеколони та ін.), штучного рожевого масла, ароматів для мила, косметичних виробів (наприклад, засоби для макіяжу), шампунів та засобів для догляду за шкірою	Е-номер не надано
---------------	---------------	---	-------------------

Отже, проаналізувавши вищеописану інформацію можна підсумувати, що ринок харчових добавок безупинно зростає, зважаючи на значний їх попит. Водночас така тенденція спонукає до пошуку нових екологічно чистих джерел одержання харчових добавок, зважаючи на строгі вимоги до їх безпечності. Тому сучасні біотехнологічні підходи мають стосуватись покращення процесів культивування мікроорганізмів для синтезу необхідних харчових добавок.

РОЗДІЛ 2. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ПІДХОДИ ОДЕРЖАННЯ ХАРЧОВИХ ДОБАВОК

Літературні дані засвідчують недоцільність використання хімічного синтезу ряду харчових добавок. Все більше науковців займаються дослідженням синтезу та підходів з оптимізації умов для отримання необхідних метаболітів шляхом мікробного синтезу. Тому розглянемо наукові дані щодо біосинтезу харчових добавок.

2.1. Антиоксиданти і регулятори кислотності

Аскорбінова кислота є важливим вітаміном для оптимального росту організмів, включаючи людський організм. Водночас аскорбінова кислота є потужним антиоксидантом та підкислювачем, тому знайшла застосування у харчовій галузі в ролі антиоксиданта та регулятора кислотності. Складність і дороговартісність виробництва аскорбінової кислоти обумовлює необхідність розробки відносно простого і економічно ефективного способу її отримання. Таким чином, авторами статті (Banjo, Kareem, Akinduti, Popoola & Akinloye, 2019) досліджувався потенціал рекомбінантного штаму F3, отриманого злиттям протопластів *Aspergillus flavus* і *Aspergillus tamari* (номери штамів не вказано), для посиленого виробництва аскорбінової кислоти. Дослідження показало, що максимальний рівень синтезу аскорбінової кислоти становив 9,95 г/л при рН 5,0, температурі 40 °С і швидкості перемішування 100 об/хв протягом 96 годин вирощування.

					НУХТ БТЕК 02.01.22 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. Біотехнологічні підходи одержання харчових добавок	Літера	Аркуш	Аркушів
Розробник	Ткаченко У.М.						18	47
Керівник	Пирог Т.П.					18		
Н. контр						Кафедра БТМ		
Консульт								
Зав. Каф.	Стабніков В.П.							

Лактат натрію є комерційно привабливим продуктом мікробного синтезу, який використовується в ролі добавки в харчовій, фармацевтичній та косметичній промисловості. Автори праці (He, Fang, Qiu & Bao, 2021) дослідили збільшення виробництва лактату натрію шляхом посилення трансмембранного транспорту Na^+ у *Pediococcus acidilactici* ZY271 (pZY36e-RS02775). Так, шляхом твердофазного культивування за внесення 25 % (масова частка) ферментативно гідролізованої пшеничної соломи як субстрату вдалось одержати 132,4 г/л лактату натрію. Слід зазначити, що дане дослідження є перспективним, адже на такому дешевому субстраті як пшенична солома науковці одержали високі концентрації цільової харчової добавки.

Молочна кислота є перспективною сполукою, яка має різноманітне промислове застосування, наприклад у харчовій, текстильній, косметичній та фармацевтичній промисловості. Окрім використання в якості органічної біодеградабельної і біосумісною сировини, молочну кислоту можна використовувати для виробництва різноманітних похідних, таких як полімолочна кислота, акрилова кислота, піровиноградна кислота, 1,2-пропандіол і лактатний ефір. Лактат кальцію – це кінцевий продукт молочнокислого бродіння, що утворюється при додаванні карбонату кальцію або гідроксиду кальцію як нейтралізатора, є важливою харчовою добавкою. Так, початкова концентрація глюкози при культивуванні *Bacillus coagulans* H-1 з метою синтезу лактату кальцію становила 200 г/л, після вичерпання вносили субстрат, підтримуючи його концентрацію на рівні 60 г/л. Процес проводили в наступному режимі: температура 52 °С, швидкість перемішування 80 об/хв, тривалість – 16 год. За таких умов рівень синтезу цільової добавки склав 168 г/л (Xu & Xu, 2014).

Інші дослідники продемонстрували спосіб синтезу лактату кальцію з використанням клітин *Enterococcus mundtii*, іммобілізованих в альгінаті натрію з активованим вугіллям (Zhao, Liu & Ma, 2020). Цікавим є те, що було використано суміш субстратів, що містила глюкозу (120 г/л) і порошок ячної шкаралупи (80 г/л). Концентрацію метаболіту становила 101,02 г/л.

Ниткоподібні гриби широко використовуються для синтезу численних

продуктів, які включають ферменти, функціональні харчові продукти та органічні кислоти, а останнім часом у нанобіотехнологіях для виробництва наночастинок. Одним з найважливіших є гриб *Aspergillus niger*, який використовується для промислового виробництва органічних кислот. Багато мікроорганізмів перевірено на здатність до синтезу лимонної кислоти (добавка E330), включаючи такі бактерії, як *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis* і *Corynebacterium* spp. і гриби, такі як *Aspergillus niger*, *A. awamori* і *A. foetidus*, а також деякі штами *Penicillium* – *P. simplicissimum* і *P. restrictum*. Дріжджі, такі як *Candida lipolytica*, *C. intermedia*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida tropicalis*, *Pichia kluyveri* і *Saccharomyces cerevisiae* також використовувалися для виробництва лимонної кислоти. До промислово важливих мікроорганізмів відносять гриб *Aspergillus niger*, який демонструє величезну екологічну та метаболічну різноманітність (Adeoye & Lateef, 2021).

Штам *A. niger* LCFS 5 показує здатність до продукування лимонної кислоти на середовищі з яблучного соку кешью з додаванням 10 % сахарози, рН середовища доводили до 6,5 розчином їдкою натру. Культуру інкубували при 30 ± 2 °C протягом 12 днів. Кількість лимонної кислоти склала 92,8 г/л. Подальший аналіз ферментованого яблучного соку кешью показав чистоту відновленої кислоти на рівні 69,91%, показуючи придатність соку яблука кешью як субстрату (Adeoye & Lateef, 2021).

Біологічне виробництво бурштинової кислоти привернуло велику увагу через виснаження викопного палива та занепокоєння щодо екологічних проблем. У харчовій промисловості бурштинову кислоту можна використовувати як підсилювач смаку в напоях, розм'якшувач хліба, каталізатор для приготування харчових приправ (харчова добавка E363). Бурштинова кислота є проміжною сполукою, яка виникає в циклі трикарбонових кислот, але також є кінцевим продуктом анаеробного метаболізму багатьох мікроорганізмів, таких як *A. niger*, *Yarrowia lipolytica*, *S. cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Actinobacillus succinogenes*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens* та *Mannheimia succiniciproducens*. Так, *C. glutamicum* NC-3-1 в середовищі з глюкозою у кількості 172,7 г/л утворює 113 г/л бурштинової кислоти. При цьому глюкозу вносили

порційно – спочатку середовище містило 66,1 г/л глюкози, через 8, 18 і 30 годин додавали глюкозу у концентраціях 37,9, 36,2 і 32,5 г/л (Yang et al., 2020).

У праці (Thuy, Kongkaew, Flood & Boontawan, 2017) показано перспективність використання штаму *A. succinogenes* ATCC55618 для синтезу бурштинової кислоти. В якості субстрату виступав гідролізований сік кореня маніоки з вмістом редукуючих цукрів 255 г/л. Температуру підтримували на рівні 35 °C, а рН автоматично доводили до 6,8 додаванням 40% MgCO₃. Швидкість перемішування була зафіксована на рівні 200 об/хв. При цьому синтез цільової харчової добавки був на рівні 151,44 г/л.

Нікотинова кислота та її амід (нікотинамід) є вітамінами В-комплексу (вітамін В₃ або РР), які використовуються у фармацевтичних препаратах, а також як добавки до харчових продуктів і кормів – наприклад, як стабілізатор пігментації в в'яленому м'ясі (Hrubša et al., 2022).

Так, досліджено утворення 129,2 г/л нікотинової кислоти штамом *Escherichia coli* BL21(DE3) з 1050 мМ 3-ціанопіридину за 20,8 год з підживленням. Оптимуми температури та рН становили 37 °C та 6,6 відповідно, а найкраща термостабільність нітрилази спостерігалася при 25 °C, яка зберігала 95% активності після 120 годин інкубації. Такий синтезувальний потенціал дає змогу використовувати штам *E. coli* BL21(DE3) у промислових умовах (Fan et al., 2017).

Глюконова кислота є м'якою органічною кислотою, яка викликала великий інтерес. Глюконова кислота надає освіжаючого кислого смаку багатьом продуктам харчування (Ahmed, Farag, Hassan & Botros, 2015).

Glucanobacter oxydans NCIM 2095 культивували в середовищі з гідролізованим соком цукрової тростини з концентрацією по глюкозі 61,4 г/л для одержання глюконової кислоти. Процес біосинтезу здійснювали при 250 об/хв за температури 30 °C протягом 15 год за допомогою інтегрованої мембранної технології, що включає кілька етапів. При швидкості подачі свіжого середовища 0,15 м/с концентрація глюконової кислоти становила 44,7 г/л. Другий етап полягає в нанофільтрації для концентрування глюконової кислоти, концентрація якої досягла 93 г/л (Banerjee, Kumar & Pal, 2018).

Як відомо, гриби також є перспективними агентами для біосинтезу регуляторів кислотності. Досліджено вплив морфології *Aspergillus niger* AN151 на продукцію глюконової кислоти (Lu et al., 2015). За 14,5 год при 38 °С, аерації 1,2 об/об/хв та швидкості перемішування 550 об/хв з концентрацією глюкози 330 г/л вдалось отримати 310 г/л глюконової кислоти.

Спільне виробництво полі-3-гідроксибутирату та глюконової кислоти з глюкози за допомогою *Halomonas elongata* 1Н9Т досліджено у праці (Leandro, Oliveira, da Fonseca & Cesário, 2023). Спільне виробництво полі-3-гідроксибутирату і глюконової кислоти (133 г/л) спостерігалось при періодичному культивуванні глюкози (50 г/л) з живленням (600 г/л) в умовах обмеження азоту. Температуру та рН підтримували на рівні 35 °С та 7,5 відповідно. Під час культивування концентрацію розчиненого кисню (DOC) встановлювали на рівні 20% насичення. Це значення підтримувалося, використовуючи постійну швидкість аерації 2,6 л повітря /хв, контролюючи швидкість перемішування між 200 і 1200 об/хв.

Додаткові дані щодо синтезу антиоксидантів і регуляторів кислотності мікробним шляхом представлено у табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Синтез антиоксидантів і регуляторів кислотності мікробним шляхом

Е-номер	Харчова добавка	Продуцент	Субстрат, концентрація	Концентрація метаболіту	Література
Е300	Аскорбінова кислота	Рекомбінантний штам F3, отриманий злиттям протопластів <i>Aspergillus flavus</i> і <i>Aspergillus tamari</i> (номери штамів не вказано)	Глюкоза, 2 %	9,95 г/л	Banjo, Kareem, Akinduti, Popoola & Akinloye, 2019
		<i>Aspergillus tamari</i> (номер штаму не вказано)	Глюкоза, 2%	7,25 г/л	Banjo, Kareem, Popoola & Akinloye, 2018
		<i>Kluyveromyces lactis</i> JVC1-56	Д-галактоза, 2%	30 мг/л	Rosa et al., 2013
Е 325	Лактат натрію	<i>Pediococcus acidilactici</i> ZY271 (pZY36e-RS02775)	Твердо-фазне культивування, 25 % (масова частка) ферментативно гідролізованої пшеничної соломи	132,4 г/л	He, Fang, Qiu & Bao, 2021
Е 327	Лактат кальцію	<i>Bacillus coagulans</i> H-1	Періодичний процес у 5 л реакторі з 2,5 л середовища: Початкова концентрація глюкози 200 г/л, після вичерпання вносять субстрат, підтримуючи концентрацію на рівні 60 г/л	168 г/л	Xu & Xu, 2014
		<i>Enterococcus mundtii</i> Клітини, іммобілізовані в альгінаті натрію з активованим вугіллям	Глюкоза 120 г/л і порошком яєчної шкаралупи 80 г/л	101,02 г/л	Zhao, Liu & Ma, 2020
		<i>Lactobacillus plantarum</i> CGMCC 6193	М'яса, 130 г/л	70,28 г/л	Pat. CN102888352B

Продовження таблиці 2.1

E330	Лимонна кислота	<i>Aspergillus niger</i> LCFS 5	Сік кешью + 10 % сахарози, hН доводили до 6,5 розчином їдкою натру	92,8 г/л	Adeoye & Lateef, 2021
		<i>Aspergillus niger</i> EB-12	Гідролізована меляса, 150 г/л + гідролізоване куряче пір'я, 4 г/л, рН 6.0	64,40 г/л	Ozidal & Kurbanoglu, 2019
E363	Бурштинова кислота	<i>Basfia succiniciproducens</i> BPP7	Ферментативно гідролізована лігноцелюлозна біомаса очерету (<i>Arundo donax</i>)	17 г/л	Cimini et al., 2016
		<i>Corynebacterium glutamicum</i> NC-3-1	Глюкоза 172,7 г/л. Спочатку середовище містило 66,1 г/л глюкози, через 8, 18 і 30 годин додавали глюкозу при 37,9, 36,2 і 32,5 г/л/	113 г/л	Yang et al., 2020
		<i>Actinobacillus succinogenes</i> ATCC55618	Гідролізований сік кореня маниоку з вмістом редукуючих цукрів 255 г/л	151,44 г/л	Thuy, Kongkaew, Flood & Boontawan, 2017
		<i>Actinobacillus succinogenes</i> BE-1	Глюкоза 600 г/л	145.20 г/л	Dessie et al., 2018
		<i>Actinobacillus succinogenes</i> 130Z	Молочна сироватка (+карбонат магнію)	13,41 г/л	Omwene et al., 2021
E 375	Нікотинова кислота	<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	1050 мМ 3-ціанопіридину	129,2 г/л	Fan et al., 2017
		<i>Gordonia terrae</i> (номер штаму не вказано)	50 мМ 3-ціанопіридину. Субстрат (75 мМ) 3-ціанопіридину подавали з інтервалом 15 хвилин, тоді як нітрилаза цілої клітини в реакції становила 10 Од/мл.	Утворення нікотинової кислоти з 3-ціанопіридину з швидкістю 15,3 г/год/г клітин	Monika, Sheetal, Thakur & Bhalla, 2022

Закінчення таблиці 2.1

E574	Глюконов а кислота	<i>Gluconobacter oxydans</i> (NCIM 2095)	Гідролізований сік цукрової тростини з концентрацією по глюкозі 61,4 г/л	93 г/л	Banerjee, Kumar & Pal, 2018
		<i>Gluconobacter oxydans</i> DSM 2003	Попередньо оброблену та детоксиковану за участю штаму грибів <i>Amorphotheca resinae</i> ZN1 кукурудзяну солому з вмістом 35,4% целюлози і 24,6% геміцелюлози піддавали ступінчатому ферментативному гідролізу без розділення на тверду (35 %) та рідку фазу.	118,9 г/л глюконової кислоти та 59,3 г/л ксилонової кислоти	Hou, Zhang & Bao, 2018
		<i>Aspergillus niger</i> AN151	330 г/л глюкози	310 г/л	Lu et al., 2015
		<i>Aspergillus niger</i> (номер штаму не наведено)	Гідролізат плодів хлібного дерева, 120 г/л	109,95 г/л	Ajala, Ajala, Ogunniyi & Sunmonu, 2016
		<i>Aspergillus niger</i> SIIM M276	Ферментативно гідролізована кукурудзяна солома, що містила 38,72% целюлози, 20,55% геміцелюлози, 26,51% лігніну, 2,76% золи. Вміст глюкози у гідролізаті становив 80, 21 г/л	76,67 г/л	Zhang, Zhang & Bao, 2016
		<i>Halomonas elongata</i> 1H9T (DSM 2581)	Початкова концентрація глюкози 50 г/л. У процесі культивування здійснювали підживлення розчином глюкози (600 г/л), підтримуючи концентрацію глюкози на рівні приблизно 50 г/л	133 г/л глюконової кислоти одночасно з синтезом полігидроксибутирату (вміст у біомасі 53%, або 21,2 г/л)	Leandro, Oliveira, da Fonseca & Cesário, 2023

З таблиці 2.1 можна зробити висновок, що мікробіологічна галузь має значний потенціал для одержання антиоксидантів та регуляторів кислотності економічно вигідним шляхом, адже досліджені продуценти такого класу харчових добавок ростуть на доступних вуглецевих субстратах, в тому числі й відходах виробництв, утворюючи високі концентрації цільових метаболітів.

2.2. Барвники

Зовнішній вигляд, зокрема і колір, є ключовим фактором для посилення привабливості сприйняття харчових продуктів і напоїв споживачами. Виробники харчових продуктів все частіше використовують синтетичні харчові барвники для досягнення певних властивостей, таких як низька вартість, покращений зовнішній вигляд, висока інтенсивність кольору, більша його стабільність та однорідність. Різноманітні продукти харчування та напої, доступні на ринку, можуть містити деякі недозволені синтетичні барвники у надмірних концентраціях. Це може призвести до серйозних проблем зі здоров'ям, таких як мутації, рак, зниження концентрації гемоглобіну та алергічні реакції. Дослідження показують, що існує висока тенденція до використання синтетичних харчових барвників у кондитерських виробках і напоях, а деякі кондитерські вироби містять неідентифіковані барвники, включаючи текстильні (Deu, Subhashish & Nagababu 2022).

Тому важливим є дослідження та використання барвників природного походження, отриманих за допомогою біотехнологічних підходів.

До числа таких барвників відносять рибофлавін - вітамін B₂, який є одним з мікроелементів, необхідних для підтримки життєвого метаболізму людини. *Bacillus subtilis* є одним із широко використовуваних промислових біологічних агентів для виробництва рибофлавіну. Результати роботи (Xu et al., 2023) показали, що протягом ферментації з підживленням виробництво рибофлавіну штамом *B. subtilis* U3 становило 24,3 г/л, що на 18% більше порівняно з вихідним штамом *B. subtilis* S1 (20,6 г/л). Глюкозу вносили у початковій концентрації 20 г/л, далі здійснювали дробне внесення субстрату для підтримання концентрації 5 г/л упродовж 46 год культивування.

У свою чергу, дріжджі також можуть бути використані для одержання рибофлавіну. Повідомляють, що при вирощуванні *Candida famata* BRP у середовищі з сирною сироваткою (5% за лактозою) вдалось отримати 2,5 г/л рибофлавіну (Ruchala et al., 2022).

Біобарвникам надають перевагу над синтетичними барвниками, оскільки барвники природного походження не лише надають харчовому продукту характерний колір, а також містять нешкідливі біологічно активні антиоксиданти. Дослідження (Sharma & Ghoshal, 2020) було проведено з метою вивчення потенціалу агропромислових відходів (лушпиння цибулі, картопляної шкірки, лушпиння квасолі мунг і стручків гороху) для виробництва каротиноїдів з *Rhodotorula mucilaginosa* MTCC-1403. Основними каротиноїдними сполуками, які були виявлені в результаті дослідження, були торуларродін, β -каротин і торулен. Оптимальними умовами були рН 6,1, температура 25,8 °С і перемішування 119,6 об/хв. Так, у середовищі з лушпинням цибулі та квасолі мунг (вміст цукру 54,95 г/л і білка 22,87 г/л) концентрація каротину склала $717,82 \pm 27.64$ мг/г, а за таких самих умов каротин отриманий в умовах аеробної ферментації, становив 819,23 мг/г біомаси.

Також присутні відомості, що при культивуванні штаму *Rhodotorula glutinis* 2 на мелясі (50 г/л) кількість синтезованого каротину склала 381 мкг/г біомаси. Культуру вирощували в орбітальному шейкері (100 об/хв) при 30°C протягом 4 днів (Abd et al., 2012).

Ізопреноїди є одним із найбільших класів натуральних продуктів, що включає понад 55 000 сполук, що широко поширені у навколишньому світі. Багато з цих сполук мають біологічні функції, які часто використовуються в біомедичних і комерційних цілях – у ролі ароматизаторів та харчових добавок. В даний час ізопреноїди в основному отримують з рослин і тканин тварин у промислових масштабах. Щоб задовольнити високі вимоги та пов'язані з цим витрати, а також вирішити екологічні проблеми, метаболічна інженерія та синтетична біологія пропонують привабливу альтернативу для синтезу ізопреноїдів шляхом реконструкції гетерологічних шляхів у генетично оптимальні організми-господарі.

Автори праці (Luo et al., 2020) показали, що генетично сконструйований штам *Yarrowia lipolytica* YLlyc-9 утворює 4,2 г/л лікопіну. Вносили 100 г/л глюкози як субстрату та 30 мМ пальмітинової кислоти, при досягненні оптичної густини 0,5 вносили 10 % додекану, через дві доби культивування додавали 37,5 мМ ізопренолу у реактор. Культивували за наступних умов: температура 30 °С, перемішування 400 об/хв, швидкість аерації 1 об/об/хв.

Цікавим є і дослідження (Ma et al., 2019), у якому досліджували здатність інших дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* TM70456 до продукування лікопіну. Продукта вирощували у YPD середовищі (декстроза 20 г/л, пептон 20 г/л, дріжджовий екстракт 10 г/л). Двостадійний процес здійснювали у біореакторі, на першій стадії якого подавали підживлювальний розчин (500 г/л глюкози та 15 г/л дріжджового екстракту) для швидкого росту дріжджів. При зниженні концентрації глюкози до 1 г/л і початку стаціонарної фази вносили індуктор – галактозу (10 г/л). На другій стадії для синтезу лікопіну вносили етанол, підтримуючи його концентрацію на рівні 5 г/л. Автори зазначили, що станом на 2019 рік рівень синтезу лікопіну був найвищим показником синтезу для дріжджів і склав 2,37 г/л.

Перспективність проявляє і змішана культура штамів *Blakeslea trispora* NRRL2895 (+) та NRRL2896 (-) (Wang et al., 2023). 59,4 г/л глюкози, співвідношення (+)/(-)= 5:1. Для накопичення лікопіну у середовище додавали 2 г/л піперидину (інгібітор лікопінциклази), щоб унеможливити перетворення лікопіну у каротин. Після культивування на глюкозі з інтегрованим додаванням 150 мкмоль/л абсцизової кислоти на 3-й день, 0,5 г/л лейцину та 0,1 г/л пеніциліну на 4-й день концентрація лікопіну досягла 270,3 мг/л (Liu, Liu, Li & Tang, 2012).

Астаксантин - це каротиноїд червоного кольору , який використовується як харчова та кормова добавка. Астаксантин в основному виробляється шляхом хімічного синтезу, однак цей процес є дорогим, а синтетичний астаксантин не схвалений для споживання людиною (Kildegaard et al., 2017).

Посилене виробництво астаксантину в *Paracoccus* sp. N-81106 шляхом випадкового мутагенезу та генної інженерії розглянули автори статті Ферментацію проводили в ферментаційному середовищі з 5 г/л глюкози з підживленням

(подавали розчин глюкози 700 г/л) при 22 °С, швидкості перемішування 600 об/хв і швидкості потоку повітря 1,8 л/хв. За таких умов концентрація астаксантину досягла 480 мг/л (Ide, Noya, Tanaka & Narayana, 2012).

Дещо нижчу кількість астаксантину 432,82 мг/л отримали при вирощуванні генно-інженерного штаму *Escherichia coli* WLGB-RPP (pAX15, pTrc-ispDF) (Park et al., 2018). Початкова кількість гліцерину як субстрату - 30 г/л. У процесі культивування здійснювали дробне внесення гліцерину (817 г/л) для підтримання концентрації на рівні 0-2 г/л. Середовище містило як індуктор 0,5 мМ ізопропіл- β -D-1-тіогалакто-піранозиду. Рівень розчиненого кисню у середовищі підтримували на рівні 40% (об./об.) за допомогою автоматичної подачі суміші повітря та чистого кисню зі швидкістю 2 л/хв і автоматичного контролю швидкості перемішування від 500 до 1000 об/хв.

Майже удвічі меншу концентрацію астаксантину 285 ± 19 мг/л синтезував штам *Y. lipolytica* ST7976. Субстратом виступала глюкоза - 80 г/л. Глюкозу додавали з низькою швидкістю, щоб підтримувати її концентрацію нижче 5 г/л. Інкубували протягом 72 годин при 30 °С при перемішуванні 300 об/хв. В кінці процесу отримали 285 ± 19 мг/л цільової сполуки (Tramontin, Kildegaard, Sudarsan & Borodina, 2019).

Загальні відомості про барвники мікробної природи представлено у табл. 2.2.

Таблиця 2.2

Харчові барвники біотехнологічного походження

Е-номер	Харчова добавка	Продуцент	Субстрат, концентрація	Концентрація метаболіту	Література
E101	Рибофлавін	<i>Bacillus subtilis</i> S1	Глюкоза (початкова концентрація 20 г/л, далі - дробне внесення субстрату для підтримання концентрації 5 г/л упродовж 46 год культивування)	20,6 г/л	Xu et al., 2023
		<i>Bacillus subtilis</i> U3	Глюкоза (початкова концентрація 20 г/л, далі - дробне внесення субстрату для підтримання концентрації 5-15 г/л упродовж 46 год культивування)	24,3 г/л	
		<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	Фруктоза, 38 г/л (тривалість культивування 76 год)	11,73 г/л	Oraei, Razavi & Khodaiyan, 2018
		<i>Candida famata</i> BRP	Сирна сироватка (5% за лактозою)	2,5 г/л	Ruchala et al., 2022
		<i>Bacillus methanolicus</i> UB_Rib ^{Bs}	Метанол (150 мМ)	522,522 мг/л	Klein et al., 2023
		<i>Corynebacterium glutamicum</i> CgRibo4	Супернатант гідролізованої біомаси <i>Laminaria hyperborea</i>	1291,2 мг/л	Pérez-García, Klein, Brito & Brautaset, 2022
E160a	Каротин	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> MTCC-1403	Лушпиння цибулі + Мунг (вміст цукру (54,95 г/л) і білка (22,87 г/л))	717.82 ± 27.64 мг/г, за аналогічних умов в умовах аеробної ферментації 819,23 мг/г	Sharma & Ghoshal, 2020
		<i>Rhodotorula glutinis</i> 2	М'яса, 50 г/л	381 мкг/г біомаси	Abd et al., 2012

Продовження таблиці 2.2

E160d	Лікопін	<i>Yarrowia lipolytica</i> YLyc-9	100 г/л глюкози, 30 мМ пальмітинової кислоти, при досягненні оптичної густини 0,5 вносили 10 % додекану, 37,5 мМ ізопренолу вносили у реактор через дві доби культивування	4,2 г/л	Luo et al., 2020
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i> TM70456	YPD середовище (декстроза, 20г/л, пептон, 20 г/л, дріжджовий екстракт, 10 г/л)	2,37 г/л, 73,3 мг/г клітин	Ma et al., 2019
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i> JHY874D7	20 г/л глюкози	41,8 мг/г біомаси	Hong, Park, Kim, Kim & Hahn, 2019
		<i>Blakeslea trispora</i> NRRL2895 (+) NRRL2896 (-)	59,4 г/л глюкози, співвідношення (+)/(-)= 5:1. Для накопичення лікопину у середовище додавали 2 г/л піперидину (інгібітор лікопінциклази), щоб унеможливити перетворення лікопину у каротин	270,3 мг/л	Wang et al., 2023 Liu, Liu, Li & Tang, 2012
E161j	Астаксантин	<i>Yarrowia lipolytica</i> ST7403	Глюкоза 80 г/л	54,6 мг/л, 3,5 мг/г біомаси	Kildegaard et al., 2017
		<i>Chromochloris zofingiensis</i> ATCC30412	Глюкоза 30 г/л	38,9 мг/л	Chen, Liu & Wei, 2017
		<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> ATCC 74219	Стічні води після переробки мідій, що містять 20 г/л вуглеводів	24.64 мг/л	Amado & Vázquez, 2015
		<i>Paracoccus</i> sp. NG5	5 г/л глюкози, коли концентрація глюкози була нижчою за 5 г/л, розчин глюкози (700 г/л) подавали у ферментер	480 мг/л	Ide, Hoya, Tanaka & Harayama, 2012

Закінчення таблиці 2.2

	<i>Escherichia coli</i> WLGB-RPP (pAX15, pTgc-ispDF)	30 г/л гліцерину. У процесі культивування здійснювали дробне внесення субстрату (817 г/л гліцерину) для підтримання концентрації на рівні 0-2 г/л Середовище містило як індуктор 0,5 мМ ізопропіл- β -D-1-тіогалакто-піранозиду	432,82 мг/л 7,12 мг/г біомаси	Park et al., 2018
	<i>Yarrowia lipolytica</i> ST7976	80 г/л глюкози Глюкозу додавали з низькою швидкістю, для підтримки концентрації нижче 5 г/л	285 \pm 19 мг/л	Tramontin, Kildegaard, Sudarsan & Borodina, 2019

Барвники наразі є широко поширеною групою харчових добавок. Як видно з таблиці 2.2, до їх синтезу здатні не тільки бактерії, але й дріжджі, гриби і мікроводорості. Субстрати також відповідно різняться – від класичних цукровмісних до відходів виробництв та стічних вод. Тому біотехнологічні методи культивування барвників характеризуються своїм різноманіттям та перспективністю.

2.3. Вологоутримувальні агенти

Однією з найважливіших функціонально-технологічних властивостей продовольчої сировини та харчових систем, що визначає хід технологічних процесів, вихід, якість і терміни збереження свіжості готової продукції, є волоутримуюча здатність, тобто здатність зв'язувати і утримувати воду. Вивчення механізмів зв'язування та утримання води харчовими інгредієнтами дозволить раціонально використовувати нові види харчової сировини та прогнозувати поведінку компонентів у харчових системах під час варіння та зберігання готової продукції. Для підвищення волоутримуючої здатності сировини та харчових систем використовують харчові добавки різного походження: хімічні; біологічно активні речовини овочевих, фруктових і трав'яних добавок; різноманітні полісахариди, гідроколоїди рослинного походження, полідекстроза, ефіри целюлози; натуральна порошкоподібна речовина на основі молочних і яєчних продуктів; функціональні інгредієнти, отримані з побічних промислових продуктів; добавки різного хімічного складу на основі пшениці, сої, нуту, ферментів, мікроводоростей та ін.; наночастинки оксидів металів; мікро- та нанорозмірні м'ясні, рибні, пташині порошки (Tsykhanovska, Evlash & Blahyi, 2020).

Разом з тим, перспективним є застосування вологоутримувальних агентів мікробної природи.

Пулулан (харчова добавка E1024), в основному синтезований *Aureobasidium pullulans*, є позаклітинним водорозчинним полісахаридом. Він складається з повторюваних одиниць мальтотріози через α -(1 \rightarrow 6) глюкозидні зв'язки. Завдяки своїй особливій структурі пулулан наділений відмінними фізичними характеристиками, такими як адгезійні властивості та здатність утворювати волокна, пресовані форми та непроничні для кисню плівки. Пулулан має численні потенційні застосування в косметичці, дієтичному харчуванні, фармацевтичній промисловості, виробництві клею тощо. Повідомляють, що отриманий за допомогою індукованого мутагенезу штам *A. pullulans* UVMU6-1 протягом 114 годин ферментації синтезував 109 г/л пулулану. Проводили ферментацію з

підживленням 70%-ним розчином глюкози (40 г/л – початкова кількість), оптимізовані умови були наступними - рН 4, додавання 4 г/л Tween 80 протягом 96 годин культивування (Chen et al., 2017).

Інші дослідники культивували пулулан на сахарозі. Так, при вирощуванні *Aureobasidium melanogenum* ZH27 з 15% сахарози концентрація пулулану склала 115,4 г/л (Wang et al., 2024). Інший штаб – *A. melanogenum* A4 – вирощували на мальтозі, 50 г/л. На 96 год культивування вносили 8 г/л Tween 80, глюкозу (49 г/3 л середовища) та 1230 мл /3 л середовища 70% розчину мальтози. Кінцева концентрація пулулану становила 122,34 г/л (Chen et al., 2019).

У свою чергу, *A. pullulans* BL06ΔPMA_s з початковою кількістю сахарози 11,6% та підживленням через 36 год (вносили 800 мл розчину сахарози (140 г/л) з швидкістю 100 мл/год) утворював більше цільової речовини - 140,2 г/л (Chen, Zheng, Gao, Song & Bai, 2023).

Автори праці (Jiang et al., 2018) засвідчили, що за наявності великої кількості сахарози у середовищі (початкова - 140 г/л, кінцева – 900 г/л), рівень синтезу пулулану склав 114 г/л. Виділений із натурального меду дріжджоподібний грибок *A. melanogenum* TN1-2 культивували 134 години в аеробних умовах при 28 °С та 180 об/хв.

Як було згадано вище, для підвищення волоутримуючої здатності сировини та харчових систем використовують харчові добавки на основі ферментів.

Термофільна бактерія *Bacillus subtilis* ZIM3 може одночасно розкласти крохмаль і целюлозу в широкому діапазоні температур і значень рН. Так, за наявності 2,5% крохмалю і 2,0% карбоксиметилцелюлози утворювався комплекс ферментів з високою активністю – амілаза 2846 Од/г, целюлаза 2448 Од/г (Dai et al., 2020).

Встановлені оптимізовані умови для *Bacillus subtilis* RM16: час інкубації 24 години, температура 40°C і рН 8,0. Розмір інокулята становив 5%, крохмаль (1%) як джерело вуглецю та дріжджовий екстракт (1,5%) як джерело азоту. Іони магнію (0,1%) надавали максимальний стимулюючий ефект для виробництва амілази з активністю 380 Од/мл, яка може бути використана в подальшому у великих

масштабах (Salman et al., 2016).

Викликає цікавість і біотехнологічне одержання ферментів протеаз – харчова добавка E 1101. Talhi зі співавторами зафіксували, що при твердофазній ферментації сільськогосподарських відходів, а саме пшеничних висівків, синтезована *Mycothermus thermophilus* MK770356 протеаза за температури 42 °C та оптимальній вологості 47% має високу активність - 1187,03 Од/мл (Talhi et al., 2022).

Лужні протеази широко використовуються в промислових процесах завдяки їх високому рН толерантності та термічній стабільності. Оптимальні умови культивування продуцента протеази *B. subtilis* PTCC 1254 були визначені наступними: рН 9, температура 37°C, час ферментації 72 год, швидкість перемішування 150 об/хв та внесення 4% інокуляту. В якості основного субстрату використовували 25% (об'ємна частка) промислові стічні води після виробництва крохмалю та жом цукрової тростини, 2 г/л. За такого економічного методу активність ферменту склала 117,43 Од/мл (Jafari, Najafpour Darzi & Zare, 2023).

Глюкозооксидаза (E1102) діє здебільшого як поглинач кисню і таким чином стабілізує харчові продукти та напої, наприклад, фруктові соки, сухе молоко, майонез, запобігаючи зміні кольору та смаку під час зберігання (Fernandes, 2010).

В літературі є відомості щодо культивування продуцентів глюкозооксидази на глюкозі. Сумарна активність ферменту *Y. lipolytica* Po1g-GOX (внутрішньо- і позаклітинна) становить 370 Од/л при наявності глюкози у концентрації 2% (Khadivi Derakshan, Darvishi, Dezfulian & Madzak, 2017). У той же час, глюкозооксидаза *A. niger* E45 при 8% глюкози як субстрату мала набагато нижчу сумарну активність – всього 69,47 Од/г клітин (Naq et al., 2014).

Інвертаза – це фермент, що складає групу харчових добавок E 1103. У роботі (Chand Bhalla, Bansuli, Thakur, Savitri, & Thakur, 2017) описано виробництво та характеристику інвертази з *S. cerevisiae* SAA-612, а також досліджено активність трансфруктозилювання для синтезу фруктоолігосахаридів. У супернатанті культуральної рідини після 27 год культивування на сахарозі (20 г/л) і мальтозі (20,5 г/л) виявили інвертазу з активністю 428 Од/ мг білка. Оптимальна

температура та рН для активності інвертази були 40 °С та 6,0 відповідно.

Також в літературі описано відомості про синтез інвертаз з більш низькою активністю, результати цих праць узагальнено в таблиці 2.3.

Лізоцим — це природний фермент, який є широко поширеним і відіграє важливу роль у вродженому імунітеті завдяки своїй потужній бактеріолітичній активності. Основною метою дослідження (Naveed et al., 2022) було дослідження виобництва лізоциму продуцентом *B.subtilis* BSN314. Культуральне середовище, що містить комбінацію з 1,5% глюкози, 2,5% пептону соєвих бобів, 0,5% K_2HPO_4 і 0,1% Твін-20, було визначено як оптимальне. При цьому одержали лізоцим активністю 55 Од/мл.

Kluyveromyces lactis K7 (АТСС-МҮА-413) також здатен до продукування лізоциму. Активність синтезованого метаболіту становила 187 Од/мл. Субстратом виступала глюкоза (90 г/л), через 28 год здійснювали підживлення розчином лактози (400 г/л) зі швидкістю 0,6 мл/хв (Ercan & Demirci, 2015).

Отже, табл. 2.3 демонструє, що метаболіти, які мають вологоутримувальну здатність, культивували глибинним методом і твердофазною ферментацією. Також цікавим рішенням дослідників є додавання суміші субстратів до ферментаційного середовища, що позитивно впливає на рівень синтезу таких харчових добавок.

Таблиця 2.3

Особливості біосинтезу харчових добавок класу вологоутримуючих агентів

Е-номер	Харчова добавка	Продуцент	Субстрат, концентрація	Концентрація метаболіту	Література
E1024	Пулулан	<i>Aureobasidium pullulans</i> UVMU6-1 (штам, одержаний в результаті УФ-мутагенезу)	Початкова концентрація глюкози 40 г/л, упродовж культивування здійснювали підживлення 70%-ним розчином глюкози	109 г/л	Chen et al., 2017
		<i>Aureobasidium pullulans</i> 201253	Суміш гідролізату картопляного крохмалю і сахарози у співвідношенні 80:20 (концентрація змішаного субстрату 100 г/л)	54,57 г/л	An, Ma, Chang & Xue, 2017
		<i>Aureobasidium pullulans</i> CCTCC M 2012259	Крохмаль маніюки 52,36 г/л	25,89 г/л	He et al., 2021
		<i>Aureobasidium pullulans</i> MG271838	Сахароза 6%, масова частка	37,55 г/л	Hamidi et al., 2019
		<i>Aureobasidium melanogenum</i> ZH27	Сахароза 15%, масова частка	115,4 г/л	Wang et al., 2024
		<i>Aureobasidium pullulans</i> BL06ΔPMA5	Початкова концентрація сахарози 11,6 (% масова частка). Через 36 год вносили 800 мл розчину сахарози (140 г/л) з швидкістю 100 мл/год. Кінцева концентрація сахарози 228 г/л	140,2 г/л	Chen, Zheng, Gao, Song & Bai, 2023

Продовження таблиці 2.3

		<i>Aureobasidium melanogenum</i> A4	Початкова концентрація мальтози 50 г/л. На 96 год культивування вносили 8 г/л Tween 80, глюкозу (49 г/ 3 л середовища) і 1230 мл /3 л середовища 70% розчину мальтози. Кінцева концентрація джерел вуглецю 303 г/л	122,34 г/л	Chen et al., 2019
		<i>Aureobasidium melanogenum</i> TN1-2	Початкова концентрація сахарози 140 г/л, кінцева – 900 г/л	114,0 г/л	Jiang et al., 2018
		<i>Aureobasidium melanogenum</i> TN3-1	140,0 г/л глюкози	110,29 г/л	Xue et al., 2019
E 1100	Амілази	<i>Bacillus subtilis</i> D19	Твердофазне культивування: 5% пшеничних висівок, 1% крохмалю, 1% дріжджового екстракту	1239 Од/г	Almana et al., 2020
		<i>Bacillus subtilis</i> ZIM3	2,5% крохмалю і 2,0% карбоксиметилцелюлози	Амілаза 2846 Од/г, целюлаза 2448 Од/г	Dai et al., 2020
		<i>Bacillus subtilis</i> RM16	Крохмаль, 1 %	380 Од/мл	Salman et al., 2016
E 1101	Протеаза	<i>Mycothermus thermophilus</i> MK770356	Пшеничні висівки, 10 г/л	1187,03 Од/мл	Talhi et al., 2022
		<i>Bacillus</i> sp. PTCC 1538	Пшеничні висівки, 6 г/л	100,7 Од/мл	Zare, Meiguni & D Najafpour, 2021
		<i>Bacillus subtilis</i> PTCC 1254	25% (об'ємна частка) промислових стічних вод після виробництва крохмалю та жом цукрової тростини, 2 г/л	117,43 Од/мл	Jafari, Najafpour Darzi & Zare, 2023

Продовження таблиці 2.3

E1102	Глюкозо-оксидаза	<i>Yarrowia lipolytica</i> Po1g-GOX	Глюкоза, 2%	Сумарна активність (внутрішньо-позаклітинна) 370 Од/л	Khadivi Derakshan, Darvishi, Dezfulian & Madzak, 2017
		<i>Aspergillus niger</i> E45	Глюкоза, 8%	69,47 Од/г клітин (внутрішньоклітинний фермент)	Haq et al., 2014
E 1103	Інвертаза	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SAA-612	Сахароза, 20 г/л та мальтоза, 20,5 г/л	428 Од/ мг білка у супернатанті	Chand Bhalla, Bansuli, Thakur, Savitri, & Thakur, 2017
		<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 9642	Сахароза, 210 г/л Твердофазне культивування з використанням як твердого носія перліту	41,69 Од/мл - інвертази та активність інулінази- 5,88 Од/мл	Guerrero-Urrutia, Volke-Sepulveda, Figueroa-Martinez & Favela-Torres, 2021
		<i>Aspergillus niger</i> IBK1	Подрібнена шкірка ананаса, 12 г/л Сахароза, 10 г/л	20,26 Од/мл 22,64 Од/мл	Oyedeji, Bakare, Adewale, Olutiola & Omoboye, 2017
		<i>Penicillium</i> spp. (номер штаму не наведено)	Подрібнена апельсинова шкірка, 50 г/л	1,98 Од/мл	Nehad & Atalla, 2020

Закінчення таблиці 2.3.

E 1105	Лізоцим	<i>Bacillus subtilis</i> BSN314	Глюкоза, 15 г/л Пептон, 25 г/л Твін-20, 1 г/л	55 Од/мл	Naveed et al., 2022
		<i>Kluyveromyces lactis</i> K7 (ATCC-MYA-413)	Глюкоза, 90 г/л Через 28 год здійснювали підживлення розчином лактози (400 г/л) зі швидкістю 0,6 мл/хв	187 Од/мл	Ercan & Demirci, 2015

2.4. Загусники, стабілізатори та емульгатори

Харчові загусники та емульгатори широко використовуються для зміни реологічних і текстурних властивостей, а також для підвищення якості. Поліпшення здатності зв'язувати вологу, структурна модифікація та зміна властивостей текучості є основними функціями харчових загусників. Встановлено, що модифіковані крохмалі, протеїни, окремо або в поєднанні з ексудатами та камедями насіння, екстрактами морських водоростей і мікробними полісахаридами, мають здатність покращувати смак продукту, його властивості та стабільність (Himashree, Sengar & Sunil, 2022).

Досліджено здатність представника азотобактерій *Azotobacter vinelandii* AT9 до синтезу альгінату для його використання в якості харчової добавки (E401). Оптимальними умовами для синтезу альгінату штамом-продуцентом були температура 29 °C зі швидкістю повітряного потоку 1 л/хв. Виробництво альгінату за цих умов становило 2,9 г/л в суміші з полігідроксибутиратом (Medina et al., 2023).

Інший штам азотобактерій *A. vinelandii* NRRL-14641 досліджено з метою оцінки доцільності використання різних агропромислових відходів, таких як пшеничні висівки, для виробництва альгінату. При ферментації 7,5% (мас./об.) пшеничних висівок максимальне утворення альгінату було зареєстровано через 48 годин інкубації з 6% (об./об.) розміром інокулята при рН 7,0, 30°C і швидкості перемішування 200 об/хв - 7,46 г/л. Дане дослідження показало, що альгінат можна ефективно виробляти з використанням дешевих сільськогосподарських відходів для збереження економічних ресурсів (Saeed et al., 2016).

Ксантанова камедь - це мікробний екзополісахарид, який промислово виробляється з джерел вуглецю шляхом ферментації з використанням грамнегативної бактерії *Xanthomonas campestris*. Ксантанова камедь при диспергуванні у воді швидко утворює в'язкий, стабільний розчин навіть при низьких концентраціях. Завдяки псевдопластичності камеді її розчин у воді є відповідним загусником, стабілізатором і суспендуєчим агентом у багатьох харчових продуктах (Habibi & Khosravi-Darani, 2017).

Виробництво ксантанової камеді з *X. campestris* NRRL B-1459 шляхом

ферментації побічних продуктів фінікової пальми описано у статті (). Максимальний рівень синтезу ксантану 24,5 г/л було отримано з 60 г/л глюкози, 3 г/л сульфату амонію при порційній ферментації при рН 7, температурі 28°C, 48 год при перемішуванні 180 об/хв (Salah, Chaari, Besbes, Blecker & Attia, 2011).

Як джерело вуглецю для виробництва ксантану у дослідженні (Ghashghaei, Soudi & Hoseinkhani, 2016) використовували низькосортний концентрат виноградного соку (розведений до 40 г/л за вуглеводами). За оптимізованих умов синтез ксантану *X. campestris* pv. *campestris* b82 становив 14,35 г/л протягом 72 год вирощування – швидкість обертів 200 об/хв, кількість інокуляту 10%.

Лактоза сирної сироватки була використана як джерело вуглецю для виробництва ксантанової камеді з *X. campestris* PTCC1473. Після 48 годин культивування з використанням вказаного продуцента найвища концентрація ксантану (16,4 г/л) була досягнута при 65,2 г/л сирної сироватки (39,1 г/л лактози), 14,8 г/л фосфату (KH_2PO_4) і 1,1 г/л магнію ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Культивування проводили при 28°C і 250 об/хв протягом 48 год (Niknezhad, Asadollahi, Zamani, Biria & Doostmohammadi, 2015).

Манітол (E421) широко використовується в у харчових продуктах функціонального призначення завдяки своїм чудовим властивостям, таким як антиоксидантний захист, регуляція осмотичного тиску та інші. Основною перешкодою для мікробного виробництва маніту в промислових масштабах є низька економічна ефективність через високу вартість середовища культивування, втрати фруктози, низьку продуктивність маніту. Тому наразі активно вивчаються стратегії регулювання процесу отримання маніту, включаючи використання недорогих субстратів, вдосконалення високопродуктивних штамів тощо. Показано, що *Lactobacillus intermedius* (номер штаму не вказано) виробляє маніт у високих концентраціях (227 г/л) на суміші субстратів - фруктоза, 150 г/л, та інулін, 250 г/л (Zhang et al., 2018).

Інші дослідники також використовували суміш субстратів, а саме глюкозу та фруктозу у співвідношенні 1:2 – вміст вуглеводів 200 г/л. Повідомили, що *Fructobacillus tropaeoli* CRL 2034 синтезує 98,39 г/л маніту при температурі 30 °C і

pH 5,0 протягом 24 годин. Таким чином, показник виходу склав 77,47%, що є багатообіцяючим результатом (Ruiz Rodríguez et al., 2017).

Харчова добавка курдлан широко використовується як стабілізатор, загусник або текстуратор у таких харчових продуктах як тофу, локшина, м'ясні продукти та желе, завдяки своїй здатності утворювати еластичний гель і стабільності під час нагрівання та після обробки заморожуванням-розморожуванням (Nishinari, Zhang & Funami, 2021).

Agrobacterium sp. ATCC 31749 використовувався для дослідження молекулярного механізму біосинтезу курдлану. Максимальний рівень синтезу курдлану $47,97 \pm 0,57$ г/л було отримано при використанні оптимального середовища, що містило 60 г/л сахарози при температурі 30 °C і 280 об/хв після 96 годин вирощування (Gao et al, 2020).

У роботі (Anane et al., 2017) оцінено покращення виробництва курдлану штамом *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 за допомогою культурального середовища, що містило сік коренів і нижньої частини спаржі (10%) з додаванням сахарози у концентрації 10 г/л (по 5 г/л вносили на початку культивування і через 48 год). Процес проходив при 30 °C, обертанні 200 об/хв протягом 168 годин. Концентрація курдлану склала 40,2 г/л. Синтезований на відходах спаржі курдлан містив 1,2 та 1,5 мкг/мл флавоноїдів та сапонінів відповідно – такі речовини проявляють широкий спектр позитивного впливу на організм людини.

Підсумовуючи вищеописане, загусники, емульгатори та стабілізатори також можна ефективно одержати при культивуванні мікроорганізмів. При цьому субстратами можуть слугувати цукри, цукровмісні сполуки та навіть відходи виробництва біодизелю та інші побічні продукти, а рівень синтезу такої групи харчових добавок має пряму залежність від особливостей продуцента та середовища його вирощування.

Таблиця 2.4

Узагальнені відомості щодо біосинтезу загусників, стабілізаторів та емульгаторів для харчової галузі

Е-номер	Харчова добавка	Продуцент	Субстрат, концентрація	Концентрація метаболіту	Література
E401	Альгінат	<i>Azotobacter vinelandii</i> AT9	Сахароза, 20 г/л	2,9 г/л + полігідроксибутират (вміст у біомасі 60%)	Medina et al., 2023
		<i>Azotobacter nigricans</i> FCBP-PB-0422	Висушене при 60 °С і подрібнене до розміру 0,1 мм картопляне лушпиння, 10 г (вносили у колбу на 250 мл і додавали 20 мл дистильованої води)	205 мг/г сухого субстрату	Saeed et al., 2021
		<i>Azotobacter vinelandii</i> NRRL-14641	Висушені при 60 °С і подрібнені до розміру 0,1 мм яблучні шкірки, 10 г (вносили у колбу на 250 мл і додавали 30 мл дистильованої води)	180,64 мг/г сухого субстрату	Saeed, Mehmood & Irfan, 2023
		<i>Azotobacter vinelandii</i> NRRL-14641	Пшеничні висівки, 7,5%	7,46 г/л	Saeed et al., 2016
E415	Ксантанова камедь	<i>Xanthomonas campestris</i> NRRL B-1459	Сік фінікової пальми з концентрацією глюкози 60 г/л	24,5 г/л	Habibi & Khosravi-Darani, 2017
		<i>Xanthomonas campestris</i> LREL-1	Кухонні відходи гідролізували (за наявності сірчаної кислоти упродовж 60 хв при 121°С), після чого розбавляли у два рази водою	11,73 г/л	Li et al., 2016
		<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (b82)	Розведений до 40 г/л за вуглеводами концентрат виноградного соку	14,35 г/л	Ghashghaei, Soudi & Hoseinkhani, 2016
		<i>Xanthomonas campestris</i> PTCC1473	Сирна сироватка, 65,2 г/л (з вмістом лактози 39,1 г/л)	16,4 г/л	Niknezhad, Asadollahi, Zamani, Biria & Doostmohammadi, 2015

Закінчення таблиці 2.4

E421	Манітол (маніт)	<i>Lactobacillus intermedius</i> (номер штаму не вказано)	Фруктоза, 150 г/л + інулін, 250 г/л	227 г/л	Zhang et al., 2018
		<i>Candida azyma</i> NBRC10406	Відходи виробництва біодизелю, 30%	50,8 г/л	
		<i>Candida zeylanoides</i> KY 6166 w	n-Алкани, 10%	63 г/л	
		<i>Fructobacillus trophaeoli</i> CRL 2034	Глюкоза + фруктоза у співвідношенні 1:2 (вміст вуглеводів 200) г/л	98,39 г/л	Ruiz Rodríguez et al., 2017
E424	Курдлан	<i>Pseudomonas</i> sp. QL212	30,11 г/л сахароза	5,92 г/л	Yang et al., 2016
		<i>Paenibacillus</i> sp. NBR-10	Глюкоза, 50 г/л	4,82 г/л	El-Sayed, Arafat, Elsehemy & Basha, 2016
		<i>Agrobacterium</i> sp. CGMCC 11546	60 г/л сахарози 6 г/л дріжджового екстракту	47,97 г/л	Gao et al, 2020
		<i>Agrobacterium</i> sp. ATCC 31749	Сік коренів і нижньої частини спаржі, 10% + сахароза, 10 г/л (по 5 г/л вносили на початку культивування і через 48 год)	40,2 г/л	Anane et al., 2017

2.5. Консерванти

Втрата належної якості та псування харчових продуктів можуть бути спричинені широким спектром фізичних, хімічних, ферментативних та мікробних реакцій. Харчові консерванти використовуються для уникнення псування під час зберігання, розповсюдження, роздрібної торгівлі та споживання харчових продуктів. Консерванти використовуються в контрольованих кількостях і зазвичай на низьких рівнях, починаючи від мільйонних часток (ppm) і до 1–3% (масова частка). Більшість харчових консервантів є багатофункціональними, вони служать для подовження терміну зберігання шляхом пригнічення окислення або ферментативних реакцій і для забезпечення мікробної безпеки шляхом пригнічення або знищення патогенних мікроорганізмів (García-García & Searle, 2016).

Спирт етиловий – це харчова добавка під номером Е 1510, виступає консервантом у харчових продуктах. Авторами праці (Jojima et al., 2015) доведено, що періодична ферментація з підживленням з використанням оптимізованого штаму *Corynebacterium glutamicum* R (JCM 18229) призвела до виробництва етанолу на рівні 119 г/л з 245 г/л глюкози з виходом 95% від теоретичного максимуму. Умови біосинтезу – температура 33 °С, тривалість 16–20 год, рН 7,0.

Enterobacter aerogenes TISTR1468 синтезував етанол на відходах виробництва біодизелю. Початкова концентрація відходів виробництва біодизелю становила 20 г/л. При зниженні концентрації субстрату до 10 г/л вносили дві порції субстрату (на 12 і 36 год росту) до концентрації 20 г/л. Окисно-відновний потенціал середовища підтримували на рівні –350–400 мВ. Таким чином одержали 30,31 г/л етилового спирту (Sunarno, Prasertsan, Duangsuwan, Cheirsilp & Sangkharak, 2020).

Бактеріоцини також використовують в ролі консервуючих агентів. Нізин є безпечним, затвердженим і комерційно використовуваним бактеріоцином, який виробляється *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Оскільки накопичення лактату в ферментаційному середовищі знижує ріст *L. lactis* і виробництво низину, дріжджі, *Yarrowia lipolytica* ATCC 18942, що споживають лактат, і *L. lactis* subsp. *lactis* UTMC 106, одночасно культивували в середовищі на основі меляси (Ariana &

Hamed, 2017). Так, за наявності меляси (72 г/л) та соєвого шроту (20 г/л) після 24 год при 100 об/хв та 30 °C отримали 270 мг/л нізину.

Суттєво нижчу концентрацію нізину одержали при культивуванні монокультури *L. lactis* LBG2 (Siroli, Camprini, Pisano, Patrignani & Lanciotti, 2019). Соєве молоко є легкозасвоюваною речовиною, зазвичай характеризується високим вмістом білка, помірним співвідношенням β-конгліциніну і гліциніну з високим вмістом цукру. Так, у зразках соєвого молока, ферментованого штамом LBG2 через 24 та 48 год при 20°C, було виявлено 26,4 мг/л нізину.

Натаміцин є природним антимікробним пептидом, що виробляється *Streptomyces natalensis*. Натаміцин ефективно діє як протигрибковий консервант для різних харчових продуктів, таких як йогурт, ковбаси, соки, вина тощо. Крім того, він вважається загально визнаною безпечною харчовою добавкою (Meena, Prajapati, Ravichandran & Sehrawat, 2021).

Існують відомості про твердофазний спосіб культивування натаміцину. Так, при культивуванні *Streptomyces gilvosporeus* Z28 при 28 °C на середовищі з 200 г пшеничних висівок, 100 г ріпакового шроту, 9 г рисового жмиху та 9 г відходів виробництва біодизелю синтезувалось 9,62 мг натаміцину на 1 г субстрату (Zeng et al., 2019).

Інші дослідники здійснювали глибинне культивування натаміцину на глюкозі (Elsayed, Farid & El-Enshasy, 2019). *S. natalensis* NRRL 2651 культивували з глюкози 20 г/л, починаючи з 48 год кожні 24 год вносили п'ять порцій глюкози до кінцевої її концентрації 50 г/л. За температури 30 °C та перемішування 200 об/хв рівень синтезу натаміцину досягнув 2,72 г/л.

Варто згадати, що органічні кислоти часто додають до харчових продуктів як підкислювачі, ароматизатори або консерванти, інактивуючи або пригнічуючи ріст патогенних мікроорганізмів. Деякі широко використовувані органічні кислоти включають оцтову, молочну, лимонну, яблучну та аскорбінову (Gurtler, Joshua & Mai, 2014).

Оцтовокисла бактерія *Acetobacter pasteurianus* відіграє важливу роль в оцтовокислому бродінні, яке включає окислення етанолу до оцтової кислоти.

Максимальний загальний вміст кислоти, продукованої *A. pasteurianus* JST-S, становив $57,14 \pm 1,09$ г/л. Середовище містило глюкозу (5 г/л) та етанол (46 г/л), умови вирощування були наступними - $32\text{ }^{\circ}\text{C}$, протягом 36 год при 150 об/хв (Wu et al, 2018).

Інші дослідники випробували штам *A. pasteurianus* UMCC 2951 для проведення процесів ацетифікації шляхом багаторазових циклів культивування при високій температурі - $40 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Як субстрат використали суміш рисового вина і рисового оцту, що містив 35 г/л етанолу та 45 г/л оцтової кислоти. При зниженні концентрації етанолу до 0,5 % у середовище вносили 40 % свіжого середовища. Проводили аерацію в режимі 4,5 л/хв протягом 7 днів при $30 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Рівень синтезу оцтової кислоти при зазначених умовах досягнув 52 г/л (Pothimon, Gullo, La China, Thompson & Krusong, 2020).

Зростаючий попит на виробництво пропіонової кислоти та її широке застосування в деяких галузях промисловості, особливо в харчовій промисловості (як консервант), призвели до пошуків та досліджень економічно вигідних шляхів біосинтезу цієї кислоти. Пропіонова кислота може бути отримана хімічними (окислення пропанолу або пропаналу та гідроліз складних ефірів) та мікробними/біотехнологічними методами, причому останні мають значні переваги, у порівнянні з хімічними.

Так повідомляють, що штам *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875 (АСК-Tet) адаптували до синтезу високих концентрацій пропіонової кислоти культивуванням упродовж 2 місяців з дробним внесенням субстрату. Початкова концентрація лактози 80 г/л, здійснювали підживлення кожні 200 год (концентрація лактози з підживленням становила 360 г/л). Таким чином вдалось синтезувати пропіонову кислоту в концентрації 104 г/л (Ahmadi, Khosravi-Darani & Mortazavian, 2017).

Вплив змінних процесу на періодичне виробництво пропіонової кислоти досліджували автори статті (Ahmadi, Khosravi-Darani, Mohammad Mortazavian & Mashayekh, 2017). Найбільша концентрація пропіонової кислоти становила $6,66 \pm 0,32$ г/л. Відповідно до цього, найбільш придатними умовами культивування були

температура 30°C, рН 6,5, 45 г/л меляси цукрової тростини, додавання 10 г/л дріжджового екстракту, 96 годин ведення процесу. При цьому вирощували змішану культуру *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* DSM 20270 та *Lactobacillus acidophilus* PTCC 1643 з об'ємом посівного матеріалу 5 %.

Отже, консерванти є важливими продуктами біосинтезу, оскільки напряду впливають на збереження харчових продуктів та їх придатність. Варто зазначити, що науковці використовували різноманітні підходи для синтезу сполук-консервантів, що включає твердофазне вирощування, культивування з підживленням та внесення різних субстратів у поживне середовище.

Таблиця 2.5

Консерванти як продукти біосинтезу

Е-номер	Харчова добавка	Продуцент	Субстрат, концентрація	Концентрація метаболіту	Література
E1510	Спирт етиловий	<i>Corynebacterium glutamicum</i> R (JCM 18229)	Початкова концентрація глюкози 180 г/л, після 8 год культивування внесли 65 г/л глюкози. Кінцева концентрація субстрату 245 г/л	119 г/л	Jojima et al., 2015
		<i>Enterobacter aerogenes</i> V90M11	Відходи виробництва біодизелю, 30 г/л	14,77 г/л	Yuwa-amornpitak & Chookietwatana, 2016
		<i>Enterobacter aerogenes</i> TISTR1468	Початкова концентрація відходів виробництва біодизелю 20 г/л . При зниженні концентрації субстрату до 10 г/л вносили дві порції субстрату (на 12 і 36 год росту) до концентрації 20 г/л	30,31 г/л	Sunarno, Prasertsan, Duangsuwan, Cheirsilp & Sangkharak, 2020
E234	Нізин	<i>Lactococcus lactis sub sp. lactis</i> UTMC 106 та <i>Yarrowia lipolytica</i> ATCC 18942	М'яса, 72 г/л, соевий шрот, 20 г/л	270 мг/л	Ariana & Hamedi, 2017
		<i>Lactococcus lactis</i> LBG2	Соеве молоко	26,4 мг/л	Siroli, Camprini, Pisano, Patrignani & Lanciotti, 2019
		<i>Lactococcus lactis</i> (номер штаму не вказано)	Їстівна біоплівка, що складається з кукурудзяного крохмалю і карбоксиметилцелюлози (5:5) і містить 1,5% біомаси лактобактерій	3,35 мг/мл	Lan et al., 2021

Продовження таблиці 2.5

E235	Натаміцин	<i>Streptomyces gilvosporeus</i> F607	Глюкоза, 60 г/л, соєвий пептон, 20 г/л	4,4 г/л	Zong et al., 2023
		<i>Streptomyces gilvosporeus</i> Z28	Твердофазне культивування (пшеничні висівки, 200 г, ріпаковий шрот, 100 г, рисовий жмих, 9 г, відходи виробництва біодизелю, 9 г)	9,62 мг/г субстрату	Zeng et al., 2019
		<i>Streptomyces gilvosporeus</i> Z28	Глюкоза, 20 г/л, соєвий пептон, 20 г/л	6,47 г/л	
		<i>Streptomyces natalensis</i> NRRL 2651	Початкова концентрація глюкози 20 г/л, починаючи з 48 год кожні 24 год вносили п'ять порцій глюкози до кінцевої її концентрації 50 г/л	2,72 г/л	Elsayed, Farid & El-Enshasy, 2019
E260	Оцтова кислота	<i>Acetobacter pasteurianus</i> JST-S	Глюкоза, 5 г/л, дріжджовий екстракт, 5г/л, етанол, 46 г/л	57,14 г/л	Wu et al, 2018
		<i>Acetobacter pasteurianus</i> UMCC 2951	Суміш рисового вина і рисового оцту, що містить 35 г/л етанолу та 45 г/л оцтової кислоти. При зниженні концентрації етанолу до 0,5 % у середовище вносили 40 % свіжого середовища	50-52 г/л	Pothimon, Gullo, La China, Thompson & Krusong, 2020

Закінчення таблиці 2.5.

E 280	Пропіонова кислота	<i>Propionibacterium acidipropionici</i> ATCC 4875	Початкова концентрація лактози 80 г/л, підживлення кожні 200 год (концентрація лактози, внесена з підживленням становила 360 г/л)	104 г/л	Ahmadi, Khosravi-Darani & Mortazavian, 2017
		<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> DSM 20270 та <i>Lactobacillus acidophilus</i> PTCC 1643	45 г/л меляси цукрової тростини	6,66 г/л	Ahmadi, Khosravi-Darani, Mohammad Mortazavian & Mashayekh, 2017

2.6. Підсилювачі смаку та аромату

Підсилювачі смаку широко використовуються в харчовій промисловості з різних причин. Однією із основних є покращення смаку їжі, яка втратила свій смак внаслідок хімічної або термічної обробки. Наприклад, консервовані або заморожені продукти часто втрачають свій свіжий смак і додавання підсилювачів смаку може допомогти відновити його. Крім того, підсилювачі смаку також використовуються для покращення споживчих властивостей м'якої їжі, що робить її більш смачною та приємною для споживання. Ще одне використання підсилювачів смаку – це створення унікальних і виразних смаків, які природно не присутні в їжі. Наприклад, додавання певної харчової добавки до страви може створити її унікальний аромат. Це особливо важливо в харчовій промисловості, де створення унікальних смаків має вирішальне значення для залучення споживачів. Підсилювачі смаку та аромату можуть бути натуральними або синтетичними (Davila, 2023).

Розглянемо харчові добавки мікробного походження.

Глутамінова кислота це добавка під номером E621. Оптимізацію виробництва глутамінової кислоти *Corynebacterium glutamicum* PTCC проводили у праці (Fahimitabar, Razavian & Rezaei, 2021). Показано, що оптимальними умовами одержання цільового метаболіту були наступні: концентрація глюкози 90 г/л, температура 30 °С, при 180 об/хв протягом 48 годин. Через 20 годин інкубації додавали 4 ОД/мл пеніциліну G для вивільнення клітинного глутамату в середовище. Кількість синтезованої глутамінової кислоти склала 19,84 г/л.

Фініковий сік для культивування глутамінової кислоти використовували автори статті (Abdenacer, Aicha, Joseph & Nabil, 2021). Штам *C. glutamicum* 2262 вирощували у середовищі з фініковим соком з концентрацією вуглеводів 88 г/л. У процесі культивування здійснювали підживлення соком з концентрацією вуглеводів 210 г/л (глюкоза, фруктоза і сахароза 29, 23,5 і 47,5%) для підтримання концентрації вуглеводів у середовищі на рівні 0-5 г/л. Показано, що режим безперервної швидкості підживлення середовищем, що містить цукор фінікового соку, збагачений сульфатом амонію, посилював виробництво L-глутамінової кислоти приблизно в 2,35 рази більше, ніж у періодичній культурі. Такий підхід

дозволив досягти кінцевої концентрації L-глутамінової кислоти близько 138 г/л, що є одним з найвищих показників, опублікованих у науковій літературі.

Лізин гідрохлорид - підсилювач смаку з класифікаційним номером E642. Так, генно-інженерний штам *C. glutamicum* JL-69P_{tac}-Mgdh, отриманий заміною природного промотору гена *gdh* на промотор *tac* - M у хромосомі штаму JL-69, культивували у середовищі з глюкозою та мелясою. Початкова концентрація субстратів становила: глюкоза 80 г/л, меляса 40 г/л. Підживлювальний розчин (800 г/л) вносили у процесі культивування, підтримуючи концентрацію глюкози на рівні 20-30 г/л. Під час біосинтезу здійснювали також підживлення розчином біотину - 4 рази по 0,6 мг/л, що прискорило виробництво L-лізину до його кінцевої кількості 181,5 г/л (Xu, Wu, Wu & Zhang, 2018).

Метаболічна інженерія систем вуглеводного обміну в *C. glutamicum* для підвищення ефективності виробництва L-лізину досліджена у роботі (Xu, Ruan, Yu, Liu & Zhang, 2020). Виробництво L-лізину було додатково збільшено завдяки заміні фосфоенолпіруват-залежної системи поглинання глюкози та фруктози інозитолпермеазами та АТФ-залежною глюкокіназою. Рекомбінантний штам був модифікований для спільної експресії біфункціональної АДФ-залежної глюкокінази і НАДН-дегідрогенази, а також для інактивації фактора SigmaH (SigH), таким чином зменшуючи споживання АТФ і підвищення регенерації АТФ. Комбінація цих генетичних модифікацій призвела до створеного штаму *C. glutamicum* K-8, здатного продукувати $221,3 \pm 17,6$ г/л L-лізину. Початкова концентрація субстратів становила по 40 г/л глюкози та меляси відповідно. Підживлювальний розчин (400 г/л глюкози та 100 г/л меляси) вносили у процесі культивування для підтримки концентрації глюкози на рівні 5 ~ 10 г/л.

Іншого продуцента лізину вирощували також із підживленням. Штам *C. glutamicum* ZL-9 покращили шляхом раціональної розробки систем поглинання глюкози. Кінцевий штам ZL-92 міг продукувати $201,6 \pm 13,8$ г/л L-лізину при рН 7,0 (Xu, Yu, Han, Liu & Zhang, 2019).

Узагальнені відомості щодо біосинтезу підсилювачів смаку і аромату подано в таблиці 2.6.

Таким чином, підсилювачі смаку та аромату також можна одержати при культивуванні певних груп мікроорганізмів. Найбільше відомостей в літературі налічується про вирощування *Corynebacterium glutamicum*. Цю бактерію в основному культивували на глюкозовмісних субстратах, що сприяло одержанню глютамінової кислоти та лізину у досить високих концентраціях.

Таблиця 2.6

Підсилювачі смаку та аромату, одержувані мікробним синтезом

Е-номер	Харчова добавка	Продуцент	Субстрат, концентрація	Концентрація метаболіту	Література
E621	Глутамінова кислота	<i>Corynebacterium glutamicum</i> X680	Глюкоза, 12 %	27,6 г/л	Ganguly & Pattnaik, 2021
		<i>Corynebacterium glutamicum</i> NCIM2168	Глюкоза, 50 г/л	16,36 г/л	Alharbi et al., 2020
		<i>Corynebacterium glutamicum</i> PTCC	Глюкоза, 90 г/л	19,84 г/л	Fahimitabar, Razavian & Rezaei, 2021
		<i>Corynebacterium glutamicum</i> (номер штаму не наведено)	Глюкоза, 50 г/л	14,2 г/л глутамінової кислоти та 5,1 г/л лізину	Bashir et al., 2022
		<i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262	Фініковий сік з концентрацією вуглеводів 88 г/л. У процесі культивування здійснювали підживлення соком з концентрацією вуглеводів 210 г/л (глюкоза, фруктоза і сахароза 29, 23,5 і 47,5%)	138 г/л	Abdenacer, Aicha, Joseph & Nabil, 2021
E642	Лізин гідрохлорид	<i>Corynebacterium glutamicum</i> JL-69P _{tac-Mgdh} Заміна природного промотору гена <i>gdh</i> на промотор <i>tac - M</i> у хромосомі штаму JL-69	Початкова концентрація субстратів: глюкоза 80 г/л та меляса 40 г/л. Підживлювальний розчин (800 г/л) вносили у процесі культивування, підтримуючи концентрацію глюкози на рівні 20-30 г/л	181,5 г/л	Xu, Wu, Wu & Zhang, 2018

Закінчення таблиці 2.6

	<i>Corynebacterium glutamicum</i> CgΔexeR*Pst	Глюкоза 100 г/л, меляса 20 мл/л.	41 г/л	Lei et al., 2021
	<i>Corynebacterium glutamicum</i> Lys5-8	Початкова концентрація глюкоза 80 г/л. Підживлювальний розчин (800 г/л) вносили у процесі культивування, підтримуючи концентрацію субстрату на рівні 20-30 г/л	163,52 г/л	Xu, Yu, Han, Liu & Zhang, 2019
	<i>Corynebacterium glutamicum</i> K-8	Початкова концентрація субстратів: 40 г/л глюкози та 40 г/л меляси Підживлювальний розчин (400 г/л глюкози та 100 г/л меляси) вносили у процесі культивування для підтримки концентрації глюкози на рівні 5 ~ 10 г/л	221,3 г/л	Xu, Ruan, Yu, Liu & Zhang, 2020
	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ZL-92	Початкова концентрація субстратів: 80 г/л глюкози та 40 г/л меляси. Здійснювали підживлення розчином (200 г меляси та 800 г глюкози на 1,8 л води) для підтримання концентрації глюкози на рівні 5–10 г/л Кінцева концентрація глюкози 310 г/л	201,6 г/л	Xu, Yu, Han, Liu & Zhang, 2019

2.7. Підсолоджувачі

Ксилітол - це поліспирт ($C_5H_{12}O_5$), який класифікується як підсолоджувач та заміник сахарозу. Ксиліт добре засвоюється у хворих на цукровий діабет, не має карієсогенної дії та продемонстрував клінічну корисність у лікуванні остеопорозу та вагінозу. В даний час промислове виробництво ксиліту включає каталітичне гідрування очищеної ксилози з біомаси, що складається з геміцелюлозних гідролізатів. Цей процес є неефективним і дорогим через складність процедур очищення ксилози та необхідність відокремлення залишків каталізатора та побічних продуктів, що утворюються під час гідрування ксиліту (Palladino et al., 2021).

На відміну від зазначеного способу отримання ксиліту, біосинтетичний метод одержання є набагато вигіднішим. Розглянемо наукові відомості, що стосуються біосинтезу ксилітолу.

У цьому дослідженні штам, що продукує ксиліт у високій концентрації, виведено шляхом мутагенезу нещодавно виділених дріжджів *Candida tropicalis* T31 (Zhang, Qin, Dai, Mu & Zhang, 2019). У процесі ферментації використовувалася двоступенева стратегія подачі розчиненого кисню, що призвело до максимального рівня синтезу ксиліту – 79 г/л при концентрації ксилози 100 г/л. Культуру вирощували при 30 °C зі швидкістю струшування 200 об/хв протягом 72 годин.

Вплив змішаного субстрату на виробництво ксиліту *Debaryomyces hansenii* NCYC 3413 досліджували у праці (Pappu & Gummadi, 2018). Так, за наявності глюкози (10 г/л) та ксилози (90 г/л) вдалось одержати 56,42 г/л ксиліту. Вирощування здійснювали при температурі 30 °C, pH – 4,9, швидкості перемішування 500 об/хв та аерації 0,5 об/об/хв.

Еритритол є іншою харчовою добавкою, підсолоджувачем під номером E968.

Конструювання ефективного мутантного штаму *Trichosporonoides oedoccephalis* T03 з делецією гена мітоген-активованої протеїнкінази (HOG1) для виробництва еритритолу показано в статті (Li et al., 2016). Досліджено, що додавання лимонної кислоти у ферментаційне середовище на рівні 0,3% (мас./об.) зумовлювало збільшення концентрації еритритолу до 69,12 г/л. При цьому як

субстрат використали глюкозу – 200 г/л.

Інші дослідники культивували еритритол на гліцерині. Мутант *Yarrowia lipolytica* FCY218 надекспресував GUT1 і TKL1, які кодують гліцеролкіназу і транскетолазу відповідно, а ген EYK1, який кодує еритрулозокіназу, був порушений. При концентрації гліцерину 150 г/л, температурі 28 °С, рН 3, перемішуванні 800 об/хв та аерації 1 л/хв кількість еритритолу склала 80,6 г/л. Додатковою перевагою є те, що штам не міг споживати створений ним еритритол, що ще більше підвищило ефективність процесу (Carly et al., 2017).

Також в літературі є згадки про культивування еритритолу іншим штамом *Y. lipolytica* МК1 на технічному гліцерині. Початкова концентрація технічного гліцерину у середовищі становила 100 г/л, через 24 год вносили додатково 200 г/л цього субстрату. Так одержали 180,3 г/л еритритолу (Rakicka-Pustułka, Mirończuk, Celinska, Bialas & Rymowicz, 2020).

Уваги заслуговує і харчова добавка E420 – сорбіт або сорбітол. Сорбіт є нетоксичною та злегка гігроскопічною сполукою. *Zymomonas mobilis* виробляє сорбітол із сахарози або сумішей глюкози та фруктози. Рекомбінантний *Z.mobilis* може виробляти сорбіт і глюконову кислоту з глюкози та фруктози, використовуючи іони різних двовалентних металів зі зниженим виходом етанолу та значно збільшеним виходом сорбітолу. Так, при періодичному культивуванні *Lactobacillus plantarum* NCIM 2912 за температури 37°C, рН 7,0 і швидкості перемішування 150 об/хв протягом 42 год спостерігали посилене виробництво сорбітолу – 9,78 г/л (Jan, Tripathi, Singh, Surya & Singh, 2017).

Інший штам *L. plantarum* sp. ВАА-793 утворює сорбітол на тирсі деревини Меранті (Ahmad & Munaim, 2018). Найвищу концентрацію сорбіту (13,607 г/л) було отримано за оптимізованих умов – час культивування 4 год, вологість 50 % та кількість субстрату 1,0 г. Ці результати вказують на те, що оптимізація умов культивування сприяє регулюванню рівня синтезу бажаного метаболіту.

Відомості про біосинтетичні показники продуцентів харчових добавок, що належать до класу підсолоджувачів, узагальнено в таблиці 2.7.

Отже, можна зробити висновок, що зі зростанням попиту на різноманітні

продукти, що містять у своєму складі замінники сахарози, дослідження з біотехнологічного одержання замінників цукру мають розвиватись більш стрімко для забезпечення потреб цільової групи населення. Слід зауважити, що субстрати для синтезу таких підсолоджувачів є поширеними та доступними.

Таблиця 2.7

Мікробний синтез харчових добавок класу підсолоджувачів

Е-номер	Харчова добавка	Продуцент	Субстрат, концентрація	Концентрація метаболіту	Література
E967	Ксилітол	<i>Candida tropicalis</i> T31	Ксилоза, 100 г/л	79 г/л	Zhang, Qin, Dai, Mu & Zhang, 2019
		<i>Cyberlindnera xylosilytica</i> UFMG-CM-Y-309	Геміцелюлазний гідролізат жому цукрової тростини (містить 40 г/л ксилози і 5 г/л глюкози) та екстракт рисових висівок (10 г/л)	14,06 г/л	Palladino et al., 2021
		<i>Debaryomyces nepalensis</i> NCYC 3413	Глюкоза, 10 г/л та ксилоза, 90 г/л	56,42 г/л	Pappu & Gummadi, 2018
		<i>Wickerhamomyces anomalus</i> 740	Геміцелюлазний гідролізат жому цукрової тростини з концентрацією ксилози 40 г/л і глюкози 10 г/л	24,75 г/л	Carneiro, Silva & Almeida, 2019
		<i>Pseudomonas putida</i> BSX-46	Ксилоза, 100 г/л	35,2 г/л	Lugani & Sook, 2020
E968	Еритритол	<i>Trichosporonoides oedocephalis</i> T03	Глюкоза, 200 г/л	69,12 г/л	Li et al., 2016
		<i>Yarrowia lipolytica</i> FCY218	Гліцерин, 150 г/л	80.6 г/л	Carly et al., 2017
		<i>Trichosporonoides oedocephalis</i> ATCC 16958	Глюкоза, 300 г/л	59,34 г/л	Kang et al., 2019
		<i>Yarrowia lipolytica</i> PO1f-PYP-GK-TKL	Початкова концентрація гліцерину 100 г/л, у продовж культивування двічі (на 4-у і 8-у добу) вносили по 100 г/л гліцерину до кінцевої концентрації 300 г/л	58,8 г/л	Jagtap, Bedekar, Singh, Jin & Rao, 2021

Закінчення табл.уці 2.7

		<i>Yarrowia lipolytica</i> МК1	Технічний гліцерин з вмістом гліцерину 80%. Початкова концентрація технічного гліцерину у середовищі 100 г/л, через 24 год вносили додатково 200 г/л	180,3 г/л	Rakicka-Pustułka, Mirończuk, Celinska, Bialas & Rymowicz, 2020
		<i>Yarrowia lipolytica</i> MY12	Гліцерин, 100 г/л	52 г/л	Zhang et al., 2021
		<i>Yarrowia lipolytica</i> А-6	Відходи виробництва біодизелю, 220 г/л	108,0 г/л	Tomaszewska-Hetman, Rymowicz & Rywińska, 2020
E420	Сорбітол (сорбіт)	<i>Lactobacillus plantarum</i> NCIM 2912	Глюкоза, 20 г/л	9,78 г/л	Jan, Tripathi, Singh, Surya & Singh, 2017
		<i>Lactobacillus plantarum</i> sp. ВАА-793	Попередньо хімічно оброблена тирса деревини Меранті	13,516 г/л	Ahmad & Munaim, 2018

Отже, підсумовуючи розглянуті відомості щодо біосинтетичних способів одержання харчових добавок різноманітного призначення можна зробити висновок, що серед продуцентів є як бактерії, так і дріжджі, гриби та мікроводорості. Варто відмітити, що науковці застосовували методи генетичної інженерії, мутагенезу, а також різні підходи регуляції синтезу цільових сполук у процесі культивування їх продуцентів. Разом з цим, використання відходів виробництв є позитивним рішенням для отримання харчових добавок мікробного походження, що дозволяє заощадити ресурси підприємства.

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ ЯК ХАРЧОВОЇ ДОБАВКИ

3.1. Аналіз властивостей аскорбінової кислоти, галузей використання, потреби у харчовій добавці

Аскорбінова кислота (C₆H₈O₆) — органічна сполука, що належить до сімейства моносахаридів. Вона добре розчиняється у воді. Використання аскорбінової кислоти широко поширене в харчовій промисловості завдяки її антиоксидантній і стабілізуючій здатності (Varvara et al., 2016).

Однією з найважливіших властивостей аскорбінової кислоти є її відновна здатність. У присутності кисню аскорбінова кислота має тенденцію до окислення, особливо щодо металів-каталізаторів. Крім того, аскорбінова кислота може реагувати з вільними радикалами, зупиняючи ланцюгові реакції, які можуть спровокувати небезпечні наслідки для організму, такі як пухлинні патології ротової порожнини, травної системи та ін. Це дозволяє підтримувати стабільність інших важливих елементів, таких як вітамін А, Е, фолієва кислота та тіамін в харчових продуктах.

Окрім запобігання виникненню атеросклерозу, вітамін С сприяє виробленню адреналіну та ендогенного серотоніну та гідроксилюванню ароматичних сполук у печінці. Вітамін С бере участь у процесах клітинного захисту, сприяє всмоктуванню заліза в кишечнику та виведенню токсичних важких металів (таких як кадмій, нікель і свинець), з якими він здатний зв'язуватися. Його дія також важлива в синтезі карнітину у ферментативному перетворенні холестерину в жовчну кислоту або у вітамін D.

					НУХТ БТЕК 02.01.22 КР ПЗ			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробник</i>	<i>Ткаченко У.М.</i>				РОЗДІЛ 3. Техніко- економічне обґрунтування аскорбінової кислоти як харчової добавки	<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Керівник</i>	<i>Пирог Т.П.</i>						65	8
<i>Н. контр</i>						65		
<i>Консульт</i>						Кафедра БТМ		
<i>Зав. Каф.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>							

Сильна антиоксидантна активність аскорбінової кислоти, пов'язана зі здатністю встановлювати інші елементи та основні харчові фактори, спонукала промисловість розробити спеціальні добавки для використання аскорбінової кислоти в різних харчових продуктах.

Існує кілька добавок на основі аскорбінової кислоти, які наразі представлені на ринку: E300, аскорбінова кислота; E301, аскорбат натрію; E302, аскорбат кальцію; E303, аскорбат калію; E304, жирні ефіри аскорбінової кислоти (аскорбілпальмітат і аскорбілстеарат). Ці добавки містять саму аскорбінову кислоту (E300) або представлені солями (E301, E302, E303) чи ліпофільними ефірами. Ліпофільні ефіри (E304) створені з довгим ланцюгом жирних кислот для введення аскорбінової кислоти навіть у жиромісні продукти, запобігаючи прогірканню.

Усі добавки на основі аскорбінової кислоти, крім аскорбату калію E303, дозволені в Європі, США, Австралії та Новій Зеландії. У цих країнах також схвалено використання E303. Добавки на основі аскорбінової кислоти використовуються на етапах виробництва та переробки таких харчових продуктів як пиво, желатин, варення, солодощі, хліб і хлібобулочні вироби, фруктові соки, вино, рибні продукти та м'ясо. Використання добавок на основі аскорбінової кислоти дозволено діючими нормативними документами навіть у продуктах для немовлят та дитячого харчування (Varvara et al., 2016; Nahas, 2012).

Аскорбінова кислота широко використовується в хлібопекарській промисловості і в деяких країнах, наприклад у Великобританії, є єдиним хімічним окислювачем, який використовується у виробництві хліба та інших хлібобулочних виробів. Однак більша частина аскорбінової кислоти, яка використовується в харчовій промисловості та виробництві, синтезується з глюкози за допомогою поєднання ферментації та хімічних методів. Сама аскорбінова кислота є відновником, але в присутності газоподібного кисню та ферменту – оксидази аскорбінової кислоти, який природним чином міститься в пшеничному борошні – аскорбінова кислота перетворюється в дегідрформу (див. рис. 1.1) (Sahi, 2014).

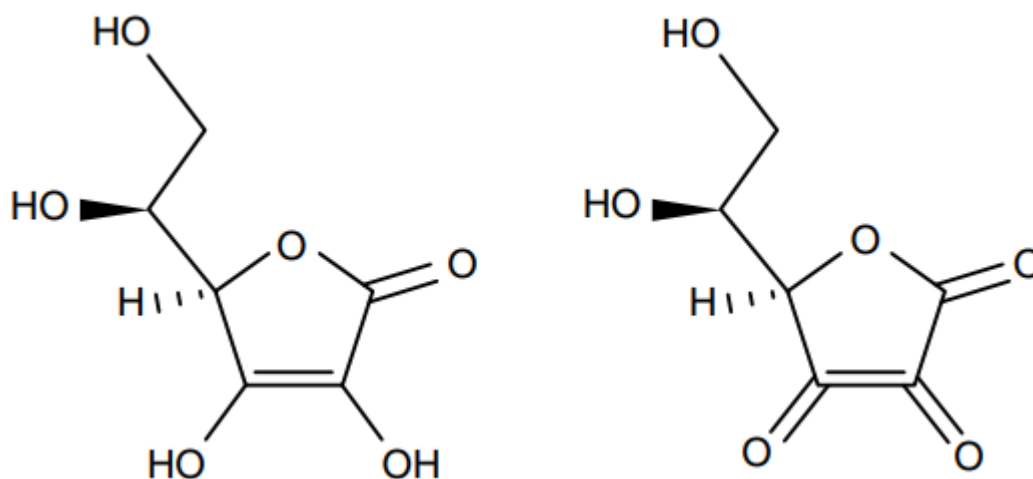


Рис. 3.1. Хімічні формули аскорбінової кислоти і дегідроаскорбінової кислоти (Sahi, 2014).

Саме ця форма має потенціал для участі в реакціях окислення, таких як стабілізація білкової мережі глютену. Застосування аскорбінової кислоти при випіканні хліба забезпечує більший об'єм хлібобулочного виробу і більш однорідну структуру м'якушки. Це може відбуватися лише до тих пір, поки присутній кисень для перетворення аскорбінової кислоти в її окислювальну форму. Дія аскорбінової кислоти в основному завершується незабаром після закінчення змішування, на цій стадії процесу дріжджі та супутні хімічні реакції конкурують за доступний кисень.

Вважається, що сульфгідрильно-дисульфідна реакція обміну (SH/SS) між сусідніми білковими ланцюгами, що містять SH-групи, є важливим механізмом у розвитку глютенної мережі. Вважається, що інша можлива реакція цього типу включає глутатіон, який природним чином міститься в борошні, але вважається, що він впливає на формування глютенної мережі, піддаючись реакціям обміну SH/SS з білковими ланцюгами. Якщо цьому не запобігти, кількість поперечних зв'язків, утворених у структурі клейковини, зменшується і утворюється слабша, більш еластична клейковина. Фермент глутатіоноксидаза відіграє роль у стабілізації глютену, запобігаючи цьому. Це проходить шляхом утворення димерів глутатіону, таким чином блокуючи шлях деполімеризації глютену (Sahi, 2014).

За кордоном при всіх прискорених способах приготування тіста з інтенсивним замісом без бродіння перед обробленням передбачається введення

аскорбінової кислоти в кількості 0,006 % до маси борошна як швидкодіючого окисника, що встигає проявити свою дію за короткий час приготування тіста.

При внесенні аскорбінової кислоти покращуються структурно-механічні властивості тіста, його газо- і формоутримувальна здатність, унаслідок чого збільшується об'єм хліба, покращується структура м'якушки, зменшується розпливання подових виробів. Передозування аскорбінової кислоти не приводить до погіршення якості виробів (Дробот, 2002).

З боку споживачів зростає тиск в бік зменшення кількості добавок, які використовуються у виробництві харчових продуктів, таких як хлібобулочні вироби, і окислювально-відновні добавки є однією з груп речовин, кількість яких має бути чітко нормована. Існує зростаюче занепокоєння щодо впливу харчових добавок на організм споживачів, наприклад, використання відновників на основі сульфідів, що має передбачати вживання відповідних заходів щодо їх подальшого використання. Тому для харчової промисловості, зокрема сектору виробництва хліба та хлібобулочних виробів, слід приділити увагу пошуку альтернативних безпечних окисно-відновних добавок. Однією з потенційних альтернатив є використання вітаміну С та його похідних, а також інших компонентів, які можуть сприяти окислювальній активності. Це збільшить вибір доступних матеріалів для виробництва хлібобулочних виробів з покращеними властивостями, що зумовить більший попит на таку харчову продукцію (Sahi, 2014).

Таким чином, науково доведено позитивний вплив аскорбінової кислоти на якість хліба та хлібобулочних виробів.

3.2. Розрахунок потреби у субстанції та розрахунок річної потреби у культуральній рідині для одержання розрахованої кількості субстанції

Аскорбінова кислота, змішана з борошном під час помелу в концентрації 0,5-3,0 г на кожні 100 кг борошна (відповідає 5-30 ppm), сприяє швидшому дозріванню борошна. Я вже було згадано, у тісті аскорбінова кислота за допомогою специфічного ферменту борошна перетворюється на дегідроаскорбінову кислоту, яка у свою чергу окислює глутатіон, що міститься у борошні, до дисульфідіду глутатіону. За допомогою цього процесу запобігає послабленню глютенної сітки

через реакцію з глутатионом і підвищується стабільність та утримування газів в тісті. Більше того, під час процесу змішування та подальшого бродіння в тістовій масі відбувається утворення дисульфідних зв'язків, структурованих міжмолекулярно та внутрішньомолекулярно, що приводить до зміцнення глютенної мережі. Таким чином підвищується стабільність і газотримувальна властивість тіста. У випадку з хлібобулочними виробами так досягається їх краща аерація та більший об'єм випеченої продукції (<https://www.ireks-kompendium.com/en/improvers-and-mixes/36-technological-effect-of-additives/361-ascorbic-acid>).



Рис. 3.2. Вплив аскорбінової кислоти на формовий хліб.



Рис. 3.3. Вплив аскорбінової кислоти на формовий хліб (поперечний зріз) (<https://www.ireks-kompendium.com/en/improvers-and-mixes/36-technological-effect-of-additives/361-ascorbic-acid>).

Згідно опублікованих даних Державної служби статистики України, чисельність постійного населення країни станом на 1 січня 2022 року досягла 40 997 698 осіб (https://www.ukrstat.gov.ua/druk/publicat/kat_u/2022/zb/10/zb_djs_2022.pdf).

Хліб вважається одним з основних продуктів харчування населення України. А в умовах економічної кризи його роль у забезпеченні організму людини основними поживними речовинами значно зросла. Традиційно українці споживають багато хлібобулочних виробів, віддаючи перевагу хлібові з житнього борошна і суміші його з пшеничним (близько 40 % асортименту споживання) та з пшеничного сортового борошна (близько 30 %). Однак до сьогодні не існує єдиної думки щодо норми добового споживання хлібобулочних виробів населенням України. Зокрема, у літературі зустрічаються цифри 120, 350, 400 і навіть 450 г на добу. Єдиною законодавчо затвердженою цифрою є норма, закладена у “споживчому кошику”, що становить 101 кг на рік (277 г на добу) (Махинько & Махинько, 2010).

Для подальших розрахунків приймемо, що будемо забезпечувати хлібом з аскорбіновою кислотою власного виробництва 1% від загальної чисельності населення України. Це пов'язано з тим, що ринок харчових продуктів станом на 2024 рік в Україні дуже різноманітний, хліб та хлібобулочні вироби містять різноманітні добавки, тому кожен споживач може обрати для себе оптимальний виріб, відповідно до своїх смакових вподобань.

Таким чином, цільова аудиторія для забезпечення становитиме:

$$\frac{40\,997\,698 \times 1}{100} = 409\,976 \text{ осіб.}$$

Останніми роками, відповідно до офіційної статистики, середньодобове споживання хліба в Україні сьогодні складає 200 г на людину (<https://agroportal.ua/publishing/lichnyi-vzglyad/spozhivannya-hlibobulochnih-virobiv-znizhuyetsya-ukrajinci-vse-bilshe-kupuyut-zamorozheniy-hlib>).

Тоді 409 976 осіб за добу споживають таку кількість хліба:

$$409\,976 \times 0,2 = 81\,995 \text{ кг}$$

Як було зазначено вище, ринок харчових продуктів станом на 2024 рік в Україні дуже різноманітний. Тому прийємо споживання хліба з аскорбіновою кислотою власного виробництва протягом 30 днів на рік. Розрахуємо річну потребу в хлібі з аскорбіновою кислотою:

$$81\,995 \times 30 = 2\,459\,850 \text{ кг}$$

Наукові результати реології тіста показали, що рецептура тіста для виготовлення хліба, що містила 200 ppm аскорбінової кислоти, була найбільш вдалою, оскільки це зумовило одержання хліба з покращеними характеристиками (Baratto et al., 2015).

Як відомо, 1 ppm = 10 000 %. Відповідно, 200 ppm = 0,02%.

Тоді у складі 2 459 850 кг хліба міститься така кількість аскорбінової кислоти:

$$\frac{2\,459\,850 \times 0,02}{100} = 491,9 \text{ кг.}$$

Отже, річна потреба в аскорбіновій кислоті як харчової добавки для виробництва хліба складає 491,9 кг.

Оптимальний рівень синтезу аскорбінової кислоти 7,25 г/л був отриманий *Aspergillus tamarii* (штам не вказано) протягом 96 годин культивування (Banjo et al., 2018).

Відповідно слід дізнатись об'єм культуральної рідини, необхідний для одержання 491,9 кг аскорбінової кислоти:

$$\begin{aligned} &7,25 \text{ г} - 1 \text{ л} \\ &491,9 \text{ кг (491 900 г)} - X \text{ л} \\ &X = \frac{491\,900}{7,25} = 67\,848,2 \text{ л} \end{aligned}$$

Врахуємо 30% втрат аскорбінової кислоти при виділенні та очищенні:

$$V_{\text{кр}} = 67\,848,2 \times 1,3 = 88\,202,6 \text{ л}$$

Розрахуємо, який обсяг культуральної рідини слід отримати за цикл біосинтезу (Карлаш, & Красінько, 2022). Приймаємо кількість трудоднів – 137, тоді об'єм культуральної рідини за добу становить:

$$V_d = V_{кр} / T_{тр} = 88\,202,6 / 137 = 643 \text{ л}$$

Кількість продукту за цикл буде становити:

$$V_{цк} = (K_1 \times V_d \times T_{цф}) / 24 = (1,1 \times 643 \times 102) / 24 \approx 3000 \text{ л/цикл},$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (96 год) та час підготовки ферментера до роботи (6 год). K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1 - 1,5$).

Підготовка ферментера включає: мийка та огляд – 1,5 год, перевірка на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізація апарату – 1,5 год, охолодження ферментера – 0,5 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год.

Визначивши об'єм КР за один цикл і знаючи коефіцієнт заповнення K_3 , визначаємо геометричний об'єм ферментера:

$$V_r = V_{цк} / K_{зап} = 3\,000 / 0,6 = 5000 \text{ л},$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$K_3 = 3000 / 5000 = 0,6$ – не перевищує заданого значення (Карлаш, & Красінько, 2022).

Отже, обрахована загальний кількість культуральної рідини за рік становитиме 88 202,6 л, а розрахований об'єм культуральної рідини за цикл - 3000 л.

РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТУ

4.1. Обґрунтування вибору біологічного агенту

Аскорбінова кислота або вітамін С, є одним із найважливіших вітамінів, які надходять до організму людини з їжею; аскорбінова кислота відіграє критичну роль у багатьох біологічних процесах. Людський організм не може синтезувати вітамін С, однак аскорбінова кислота необхідна для підтримки функціонування організму, діючи як кофактор багатьох ферментів, які беруть участь у синтезі колагену та функціонуванні імунної системи. У той же час аскорбінова кислота використовується в косметиці завдяки своїм антиоксидантним і антипігментним властивостям, у харчовій промисловості як добавка та в хімічному синтезі як відновник. Вітамін С можна синтезувати хімічно, екстрагувати з природних джерел та одержати шляхом культивування мікроорганізмів (Susa & Pisano, 2023).

Оптимальний рівень синтезу аскорбінової кислоти 7,25 г/л був отриманий *Aspergillus tamarii* (штам не вказано) при рН 5,0, температурі 40 °С і швидкості перемішування 100 об/хв протягом 96 годин культивування. Відходи пивоварного виробництва з додаванням 2% D-глюкози використовували для біосинтезу (Banjo, Kareem, Popoola & Akinloye, 2018).

					НУХТ БТЕК 02.01.22 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору біологічного агенту	Літера	Аркуш	Аркушів
Розробник	Ткаченко У.М.						73	6
Керівник	Пирог Т.П.							73
Н. контр						Кафедра БТМ		
Консульт								
Зав. Каф.	Стабніков В.П.							

Пізніше авторами статті (Banjo, Kareem, Akinduti, Popoola & Akinloye, 2019) досліджувався потенціал рекомбінантного штаму F3, отриманого злиттям протопластів *Aspergillus flavus* і *A. tamari* (номери штамів не вказано), для посиленого виробництва аскорбінової кислоти. Дослідження показало, що максимальний рівень синтезу аскорбінової кислоти становив 9,95 г/л при рН 5,0, температурі 40 °С і швидкості перемішування 100 об/хв протягом 96 годин вирощування. Культивування проводили на середовищі з відходами пивоварного виробництва за внесення глюкози в концентрації 2%.

Також в літературі представлено відомості про біосинтез аскорбінової кислоти штамом *Kluyveromyces lactis* JVC1-56, який було отримано з використанням метаболічної інженерії. Рекомбінантні дріжджі були здатні продукувати приблизно 30 мг/л L-аскорбінової кислоти за 48 годин при культивуванні на YP середовищі з 2% (мас./об.) D-галактози за 30°C та перемішуванні 200 об/хв (Rosa et al., 2013).

Інформацію про продуцентів, особливості процесу культивування, концентрацію синтезованої аскорбінової кислоти задля зручності представимо у вигляді таблиці 4.1.

Біологічних агентів порівняно за кількістю синтезованого метаболіту, тривалістю культивування та складом поживного середовища.

Як видно з даних таблиці 4.1, найбільш перспективним продуцентом є рекомбінантний штам F3, отриманий злиттям протопластів *A. flavus* і *A. tamari*, оскільки цей штам продукує найбільше вітаміну С.

Продукти аскорбінової кислоти

Продукт	Склад поживного середовища	Концентрація аскорбінової кислоти, г/л	Параметри культивування	Література
<i>Aspergillus tamarii</i> (штам не вказано)	0,6% пивоварного відпрацьованого зерна, 2% D-глюкози, 0,3% L-галактози, 0,3% дріжджового екстракту, 0,5% пептону, 0,2% глютамату натрію	7,25	pH 5,0, температура 40 °C, швидкість перемішування 100 об/хв, тривалість 96 годин	Banjo, Kareem, Popoola & Akinloye, 2018
Рекомбінантний штам F3, отриманий злиттям протопластів <i>Aspergillus flavus</i> i <i>Aspergillus tamari</i> (номери штамів не вказано)	0,6% пивоварного відпрацьованого зерна, 2% D-глюкози, 0,3% L-галактози, 0,3% дріжджового екстракту, 0,5% пептону, 0,2% глютамату натрію	9,95	pH 5,0, температура 40 °C, швидкість перемішування 100 об/хв, тривалість 96 годин	Banjo, Kareem, Akinduti, Popoola & Akinloye, 2019
<i>Kluyveromyces lactis</i> JVC1-56	20 г/л пептону, 10 г/л дріжджового екстракту 20 г/л D-галактози	0,03	тривалість 48 годин, температура 30°C та перемішування 200 об/хв	Rosa et al., 2013

Але спираючись на дані таблиці 4.1 обрати найкращого продуцента асорбцінової кислоти не доцільно, тому на наступній стадії варто обрахувати вартість поживного середовища для культивування кожного біологічного агента (табл. 4.2).

Таблиця 4.2

Вартість поживних середовищ культивування продуцентів вітаміну С

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело * (1,2,3,4,5)
<i>Aspergillus tamarii</i> (штам не вказано)	Пивоварне відпрацьоване зерно – 6	7,45	0,04	1
	D-глюкоза – 20	86	1,72	2
	L-галактоза - 3	2 490	7,47	3
	Дріжджовий екстракт – 3	1 800	5,4	4
	Пептон - 5	1 120	5,6	5
	Глутамат натрію - 2	64	0,13	6
Вартість 1 л середовища становить – 20,36 грн.				
Рекомбінантний штам F3, отриманий злиттям протопластів <i>Aspergillus flavus</i> і <i>Aspergillus tamari</i> (номери штамів не вказано)	Пивоварне відпрацьоване зерно – 6	7,45	0,04	1
	D-глюкоза – 20	86	1,72	2
	L-галактоза - 3	2 490	7,47	3
	Дріжджовий екстракт – 3	1 800	5,4	4
	Пептон - 5	1 120	5,6	5
	Глутамат натрію - 2	64	0,13	6
Вартість 1 л середовища становить – 20,36 грн				
<i>Kluyveromyces lactis</i> JVC1-56	Пептон - 20	1 120	22,4	5
	Дріжджовий екстракт – 10	1 800	18	4
	D-галактоза – 20	2 490	49,8	3
Вартість 1 л середовища становить – 90,2 грн				

Примітка: * – ціни наведено з урахуванням ПДВ станом на серпень 2024 р.:

1 – <https://tripoli.land/ua/companies/prodinvest-servis>

2 – <https://chefs-shop.com/uk/glyukoza-1kg>

3 – <https://prom.ua/p2078720213-galaktoza-chistaya.html?srsltid=AfmBOoqjcLtBa3YOc5I6Rhek9x9rLTvVKXu1f0Mw2vmzF-lJprfRJdmJ>

<drozhzhej.html?srsltid=AfmBOoq6erVCdV733MsS-><JsuZsNqo4ZgKwg5M9wEK3mgv461P7mMFNH7>5 – <https://shop.hlr.ua/pepton-fermentativnyy-pan-gis-12817.html>6 – <https://selitra.biz/uk/p220671706-gljutamat-natriju-><e621.html?srsltid=AfmBOooZ9de7dkPV-T6VPR29KmKJa9hDDL9QhdwD-><3MKSC4xQiBJAYcZrto>

Як видно з табл. 4.2, поживне середовище для культивування *Kluyveromyces lactis* JVC1-56 є найдорожчим - 90,2 грн. У той же час, середовища *A. tamarisii* та рекомбінантний штам F3 мають однакове поживне середовище і відповідно однакову вартість, яка є меншою, порівняно з *K. lactis* JVC1-56 - 20,36 грн.

На останньому етапі розраховуємо умовну вартість 1 г аскорбінової кислоти, одержаної за 1 год. За даними таблиці 4.3, *K. lactis* JVC1-56 утворює найменше аскорбінової кислоти за годину, а рекомбінантний штам F3 найбільшу кількість вітаміну С за годину - 0,10 г/л. Також відповідно умовна вартість аскорбінової кислоти, одержаної культивуванням *K. lactis* JVC1-56, є найвищою і становить 3 006,7 грн, що засвідчує недоцільність цього біологічного агента в якості основного продуцента.

Таблиця 4.3

Умовна вартість 1 г аскорбінової кислоти

Продуцент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація аскорбінової кислоти, г/л	Умовна вартість 1 г кислоти, грн	Час культивування, год	Концентрація кислоти, синтезованої за год, г/л
<i>Aspergillus tamarisii</i> (штам не вказано)	20,36	7,25	2,8	96	0,07

Закінчення таблиці 4.3.

Рекомбінантний штам F3, отриманий злиттям протопластів <i>Aspergillus flavus</i> і <i>Aspergillus tamarii</i> (номери штамів не вказано)	20,36	9,95	2,04	96	0,10
<i>Kluyveromyces lactis</i> JVC1-56	90,2	0,03	3 006,7	48	0,0006

Таким чином, серед розглянутих штамів найвищі показники аскорбінової кислоти спостерігались для штаму F3, отриманого злиттям протопластів *A. flavus* і *A. tamarii*, однак даний штам до кінця не ідентифікований, тому для зручності подальших розрахунків оберемо продуцента *A. tamarii*, здатного продукувати 7,25 г/л аскорбінової кислоти, що також є високим значенням показника.

РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ОТРИМАННЯ СУБСТАНЦІЇ АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ

Загалом технологія отримання аскорбінової кислоти включає наступні стадії:

- 1) відділення біомаси
- 2) екстракція
- 3) кристалізація
- 4) збирання кристалів
- 5) висушування кристалів

Стаття (Kuivanen, Penttilä, & Richard, 2015) повідомляє, що для ферментативних аналізів міцелій *Aspergillus niger* збирали шляхом вакуумної фільтрації. Відмічають, що виділення вітаміну С із ферментаційного середовища утруднене через його низьку стабільність у водних розчинах.

Також літературні дані повідомляють, що висушування аскорбінової кислоти проводили за допомогою сублимаційної сушарки методом ліофілізації, оскільки аскорбінова кислота розкладається при високій температурі (Jidimma Augustine, et al., 2021).

Отже, розглянемо детальніше основні етапи виділення та очищення аскорбінової кислоти.

					НУХТ БТЕК 02.01.22 КР ПЗ			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 5. Обґрунтування післяферментаційного отримання субстанції аскорбінової кислоти	<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробник</i>	Ткаченко У.М.						79	19
<i>Керівник</i>	Пирог Т.П.							79
<i>Н. контр</i>						Кафедра БТМ		
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. Каф.</i>	Стабніков В.П.							

5.1. Відділення біомаси

Методами відділення біомаси від культуральної рідини є сепарування, центрифугування та фільтрація (Лисицька, 2021).

Центрифугування – це розділення неоднорідних систем під дією поля відцентрових сил. Для центрифугування застосовують центрифуги різних конструкцій. Центрифуги, що мають високий фактор розділення й оснащені тарілчастим барабаном, називають сепараторами. У мікробіологічній промисловості вони є одним з найпоширеніших типів центрифуг (Кравченко, Савчук, & Остапченко, 2019).

Сепаратори дозволяють сконцентрувати осад до вологості 60–90 %. Також існують спеціальні герметичні сепаратори, що дозволяють проводити процес сепарування у автоматизованому режимі, оптимально підбраному для специфічних умов конкретних культуральних рідин.

Основні переваги центрифугування й сепарування – висока продуктивність і високий ступінь концентрування, що дозволяють успішно конкурувати з іншими способами отримання й концентрування як у промислових, так і в лабораторних умовах.

Однак ці способи дорожчі, ніж фільтрування. Так, серед недоліків центрифугування: складність конструкції, висока енергоємність і вартість; складність експлуатації (ненадійність, вібрація, шум тощо); вплив на клітини відцентрової сили, нагрівання, труднощі герметизації та забезпечення асептичних умов (Кравченко, Савчук, & Остапченко, 2019).

Під фільтруванням розуміють розділення твердої та рідкої фаз під час перепускання суспензії крізь пористу перегородку (фільтр). Сьогодні до методів фільтрування можна віднести і мембранні процеси відокремлення від дисперсійної фази не тільки твердих частинок, але й розчинених речовин з утворенням концентратів цих речовин і пермеатів. Найпоширенішим видом фільтрації є фільтрування з утворенням осаду (Карлаш, & Красінько, 2022).

Для фільтрації використовуються: фільтрпрес, нутч-фільтр, друк-фільтр, центрифуги, сепаратори. Фільтр-преси використовуються для обробки великих

об'ємів культуральної рідини; процес фільтрації здійснюється під тиском. Для фільтрації невеликого об'єму культуральної рідини використовують нутч-фільтри або друк-фільтри. Перший апарат працює під вакуумом, а в другому фільтрація здійснюється завдяки створенню тиску над фільтруючою рідиною (Головей, & Гуляєв, 2017).

У даному випадку доцільно використати метод фільтрування. Для цього підходить фільтр-прес в якості обладнання.

Фільтр-преси з ручним вивантаженням осаду не відповідають сучасним вимогам щодо зменшення частки ручної праці й техніки безпеки і охорони праці. Їм на зміну розроблені автоматичні фільтр-преси, які працюють за заданою програмою без втручання в процес операторів. Найбільш вдалою світовою розробкою виявились вітчизняні конструкції серії ФПАКМ. На рисунку подано схему цього фільтра (Гуляєв, 2019):

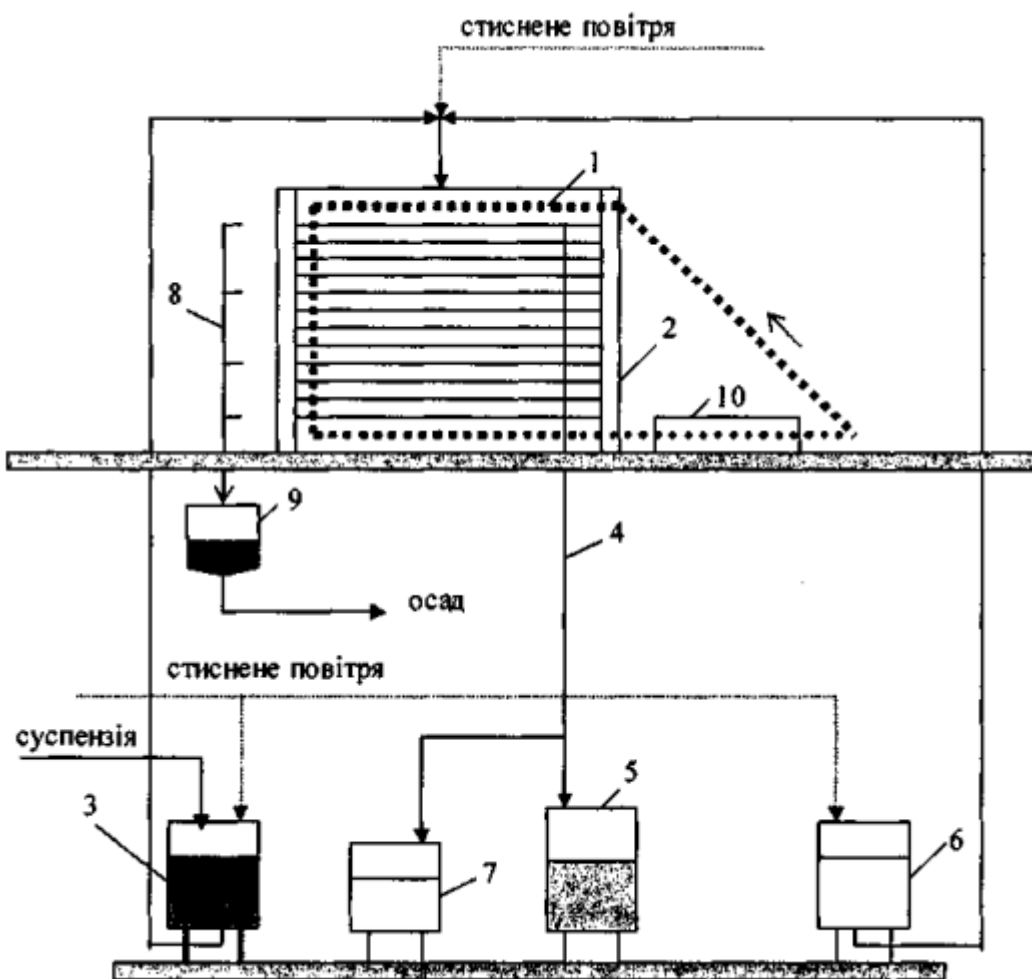


Рис. 5.1. Схема фільтр-пресу конструкції серії ФПАКМ [20].

Фільтр-прес 1 складається з горизонтальних фільтрувальних плит, розташованих одна над одною між верхньою та нижньою опірними плитами. Плити можна пересувати вверх та вниз вздовж стяжок 2. У зазори між плитами протягнута фільтрувальна тканина типу бельтинг Ф, кінці якої з'єднані між собою так, що утворюється нескінченна стрічка. Фільтрувальна плита складається із двох частин: верхньої з дренажним пристроєм для відведення фільтрату і боковим патрубком для подачі суспензії та нижньої частини, зробленої у вигляді рамки, до якої за периметром закріплені гумові шланги, в які в робочому стані подають стиснену воду. Перед технологічним циклом плити затискаються між собою, в ущільнювальні шланги подають воду. У такий спосіб створюються камери, що витримують тиск до 1 МПа. У камери зі збірника 3 стисненим повітрям чи насосом або гідравлічними пресами (не показано) подають суспензію і починається процес фільтрування. Фільтрат по колектору 4 надходить у збірник фільтрату 5. Після закінчення фільтрування і накопичення достатньо товстого шару осаду на тканині його можна промити рідиною, яку подають зі збірника 6 і яку можна спрямувати у збірник 7. На завершення процесу осад можна відтиснути гумовою діафрагмою, якою споряджена фільтрувальна плита, до вмісту вологи в біомасі 65...70% (разом із внутрішньоклітинною вологою). Після закінчення утворення осаду знімається тиск у шлангах, плити роз'єднуються, вмикається механізм пересування фільтрувальної стрічки. Під час пересування осад зрізується спеціальними ножами; по колектору 8 він виводиться у бункер 9, а далі з установки. Під час пересування стрічка проходить вузол регенерації 10. Фільтр споряджений маслонуосною станцією, пультом керування, водо насосною станцією, насосами для відведення фільтрату та промивної рідини, які на схемі не показано (Гуляев, 2019).

Отже, використаємо фільтр-прес ФПАКМ.

5.2. Екстракція аскорбінової кислоти

Після фільтрування отримують фільтрат, що містить аскорбінову кислоту.

Рідинна екстракція—процес вилучення одного або кількох компонентів з розчинів (реакційних мас) за допомогою селективних розчинників (екстрагентів). У процесі взаємодії з екстрагентом у ньому добре розчиняються лише ті

компоненти, що вилучаються і значно слабше або зовсім не розчиняються інші компоненти. Отже, при екстракції відбувається не тільки вилучення цільової речовини, але й її очищення. В результаті екстракції одержують екстракт – розчин вилученої речовини і рафінат – відпрацьований вихідний розчин.

Основною перевагою екстракції перед іншими способами виділення цільових продуктів є низька робоча температура, як правило, нормальна (кімнатна), що дуже важливо, наприклад, для виділення антибіотиків та інших термолабільних речовин. Завдяки спеціальному підбиранню екстрагенту для того чи іншого процесу цільову субстанцію можна зосередити у невеликому об'ємі екстракту, внаслідок чого відпадає необхідність упарювання реакційних мас (Карлаш, & Красінько, 2022).

Для екстракції аскорбінової кислоти були проаналізовані різні методики: рідкофазна, твердофазна, ультразвукова та мікрохвильова екстракція. Процедуру реактивної екстракції було проаналізовано для відділення вітаміну С за допомогою дихлорметану та іонообмінної смоли Amberlite LA-2 (Blaga et al., 2023).

Ступеня екстракції 96% аскорбінової кислоти з фільтрату було досягнуто за рН 2 у водній фазі та концентрації екстрагенту 160 г/л. В якості екстрагенту виступав розчин смоли Amberlite LA-2 в бутилацетаті (Blaga et al., 2023).

Тому використаємо даний спосіб для екстрагування цільового вітаміну.

5.3. Кристалізація аскорбінової кислоти

Згідно статті (Blaga et al., 2023) наступний процес включає два етапи: попереднє очищення, яке видаляє побічні продукти шляхом іонного обміну, після чого концентрують отриманий розчин у вакуумі та кристалізують при низьких температурах і в кислому середовищі.

Однак кристалізацію можна провести з отриманого на попередній стадії екстракту.

Кристалізація – це виділення твердої фази у вигляді кристалів, переважно з розчинів і розплавів. Кристалізація біологічно активних речовин заснована на різкому зменшенні їх розчинності в результаті зміни температури розчину (зазвичай зниження, але іноді й підвищення) або переведення їх у погано розчинну хімічну форму. Останнє досягається зміною рН розчину чи додаванням

відповідного реагенту, часто з одночасним зниженням температури. Кристалізація є не лише способом одержання біологічно активних речовин у твердому вигляді, але й досить ефективним засобом очищення від супутніх домішок, що є істотною перевагою порівняно з деякими іншими методами поділу (Кравченко, Савчук, & Остапченко, 2019).

Рушійною силою кристалізації, як і у всякому масообмінному процесі, є різниця концентрацій. У даному випадку це різниця між концентрацією перенасиченого розчину C і насиченого розчину C_n , у межовій дифузійній плівці, що покриває зростаючий кристал. Ця різниця концентрацій ($C - C_n$) забезпечує подолання двох опорів: дифузійного опору пограничного шару та кінетичного опору, що виникає під час введення молекули речовини в кристалічну ґратку кристалу (Стасевич et al., 2018).

У промисловій практиці застосовують різноманітні методи кристалізації, що відрізняються, в основному, способами створення перенасичення. З них найвідоміші такі три способи:

- охолодження розчину - застосовують для речовин з позитивною розчинністю, тобто розчинність яких зменшується із зниженням температури;
- вилучення розчинника випаровуванням (випарюванням) – застосовують для кристалізації речовин з негативною і дуже низькою позитивною розчинністю;
- висолювання розчинів - здійснюється додаванням речовин, що знижують розчинність компонента, який кристалізується.

Найбільше поширення отримали способи охолодження розчину і вилучення частини розчинника. У деяких випадках застосовують їх одночасно (комбінований спосіб).

Апарати, призначені для кристалізації способом охолодження розчину, називаються кристалізаторами. Вони відзначаються простотою конструкції й широко використовуються в промисловості.

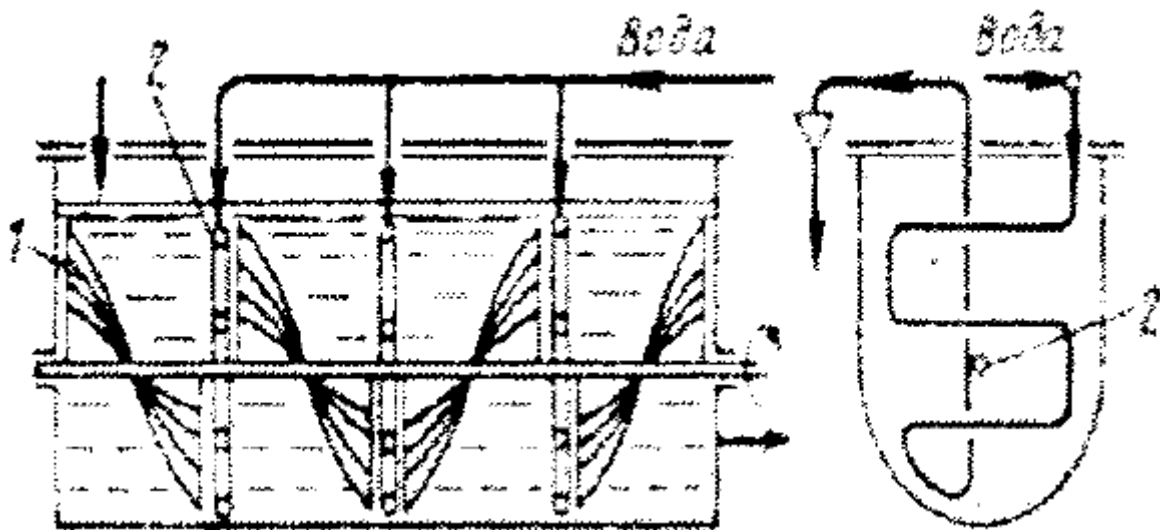


Рис. 5.2. Схема кристалізатора з охолодженням (Стасевич et al., 2018).

На рис. 5.2. зображено кристалізатор коритного типу з мішалкою 1 і штучним охолодженням, за допомогою охолоджувальних елементів 2. Охолоджувальний агент (холодна вода або розсіл) надходить у 7-9 вставлені перпендикулярно до осі апарата елементи і охолоджує розчин. Мішалка прискорює охолодження розчину, перешкоджає осіданню кристалів на дно апарата, внаслідок чого зменшується кількість центрів кристалізації. Після кристалізатора розчин, що кристалізується, спрямовується на центрифугу, де відокремлюються кристали від маточного розчину. Для проведення безперервного процесу і збільшення часу кристалізації використовують послідовне сполучення кількох кристалізаторів у батарею.

Прикладом кристалізатора з вилученням частини розчинника є вакуум-апарат періодичної дії з паровим нагріванням (рис. 2.3.). Він має цільнозварений корпус 4, всередині якого підвішені гріюча камера 2 і вловлювач - сепаратор 3. У нижній частині апарата для спуску розчину встановлено клапанний пристрій 6 з гідравлічним приводом. Гріюча камера складається з двох конічних трубних решіток 1, в які завальцьовані кип'ятільні труби 5, а до центрів решіток приварено циркуляційну трубу 7. Циркуляція розчину здійснюється таким чином: по циркуляційній трубі та кільцевому просторі, утвореному корпусом апарата і поверхнею нагріву, рідина опускається вниз, а після цього по кип'ятільних трубках парорідинна суміш піднімається вгору (Стасевич et al., 2018).

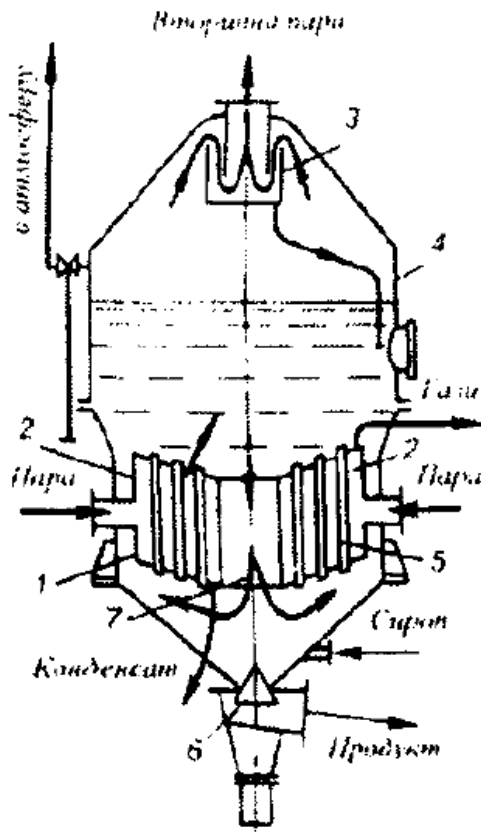


Рис. 5.3. Вакуум-апарат періодичної дії з паровим нагріванням (Стасевич et al., 2018).

Вторинна пара через сепаратор 3 поступає в конденсатор. Згущений розчин вивантажують з вакуум-випарного апарату в кристалізатор з мішалкою для завершення процесу кристалізації.

Для одержання кристалізованих жирів з метою їхнього фракціонування та облагородження використовують апарати з паровим нагрівом і водяним охолодженням. Одновальцевий кристалізатор для розплавів зображено на рис. 5.4.

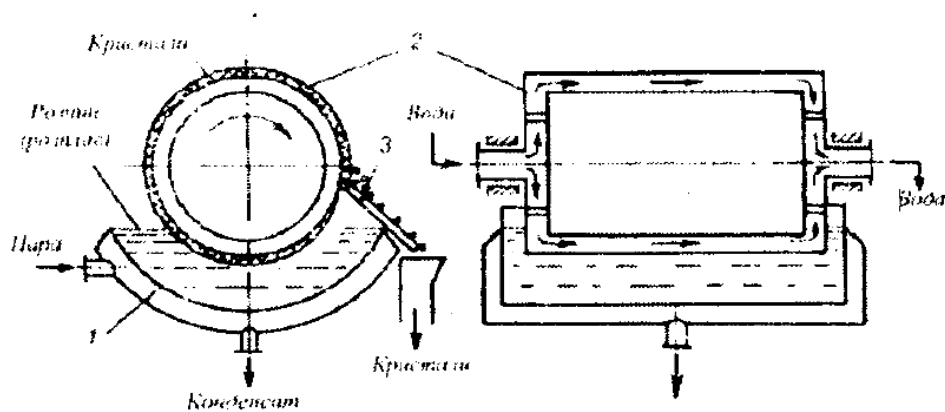


Рис. 5.4. Схема вальцевого кристалізатора (Стасевич et al., 2018).

Він складається з барабана 2 з подвійними стінками, який обертається в цапфах. Нижню частину барабану занурено в корито 1, яке обладнано оболонкою для парового обігріву. Барабан поволі обертається і своєю нижньою частиною захоплює розплав, який утворює корку кристалів на стінці (Стасевич et al., 2018).

Узагальнюючи вищенаведену інформацію, підсумуємо, що найкраще для кристалізації аскорбінової кислоти підійде вакуум-апарат періодичної дії з паровим нагріванням. Перевагою такого кристалізатора є можливість використання вторинної пари для наступного процесу кристалізації, що позитивно відображається на економічних показниках процесу.

5.4. Збирання кристалів

Відділення від маточного розчину і промивання кристалів проводять за межами апарата – на фільтрах та центрифугах (Гіріч, Єльцова, & Рябік, 2010).

В лабораторних умовах кристали, що утворилися, відділяють від маточного розчину фільтруванням з відсмоктуванням на воронці Бюхнера під зменшеним тиском. Після відсмоктування вакуум відключають, заливають кристали невеликою кількістю розчинника, перемішують їх скляною паличкою, знову включають вакуум і відсмоктують розчин. Як правило, достатньо двократної промивки кристалів холодним розчинником. Після відсмоктування і промивки осад віджимають на воронці широкою скляною пробкою, а потім переносять на фільтрувальний папір і сушать залежно від властивостей речовини або на повітрі, прикривши кристали зверху іншим листом фільтрувального паперу, або одним з раніше описаних методів [24].

У промислових умовах процес збирання кристалів фільтруванням також можна ефективно провести.

Із фільтрів періодичної дії широко використовуються фільтри, що регулюються, і можуть працювати, як під вакуумом, так і під тиском. Вакуум-фільтри виготовляють, як відкритими (рис. 2.5) так і закритими. Але в обох випадках ємність апарата під фільтрувальною перегородкою 1 сполучена зі збірником фільтрату 2, а останній - з вакуум-лінією. Таким чином під

фільтрувальною перегородкою створюється необхідне для проведення процесу розрідження (Стасевич et al., 2018).

При фільтруванні фільтрат проходить крізь фільтрувальну перегородку поступає у збірник 2; осад, що збирається на фільтрувальній перегородці, вивантажують вручну. Фільтри з плоскою фільтруючою перегородкою, що працюють під вакуумом, називають нутч-фільтрами.

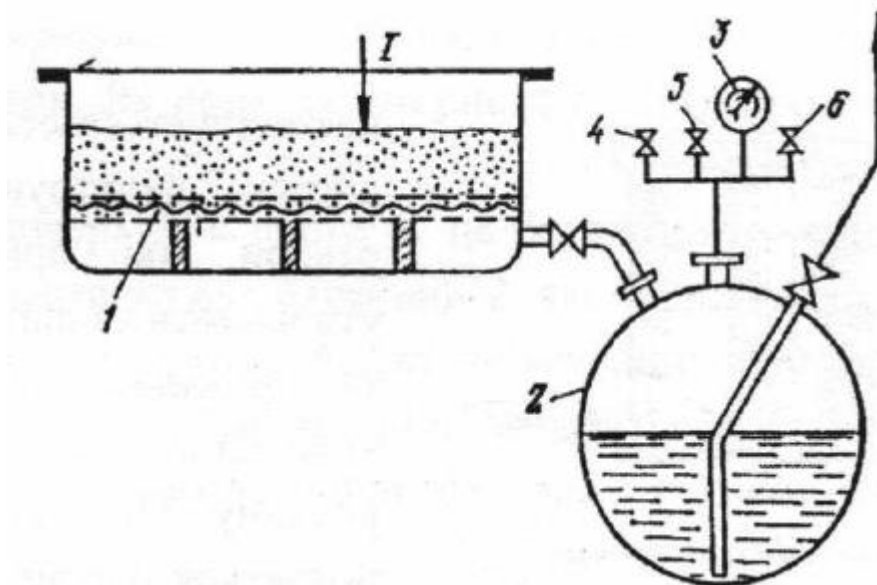


Рис. 5.5. Схема фільтрувальної установки з нутч-фільтром:

1 - фільтрувальна перегородка; 2 - збірник фільтрату; 3 - вакуумметр; 4-6 - патрубки; (4 - для стисненого повітря; 5 - для сполучення з атмосферою; 6 - для сполучення з вакуум-лінією); I - суспензія; II – фільтрат (Стасевич et al., 2018).

При фільтруванні суспензій, які утворюють осад з великим питомим опором, фільтри працюють не під вакуумом, а під тиском (0,2-0,6 МПа). Їх виготовляють у вигляді циліндричної ємності з еліптичною кришкою та днищем.

Після завантаження в апарат суспензії над нею створюють тиск, подаючи в апарат стиснуте повітря, або стиснутий інертний газ, і проводять фільтрування під тиском цього газу. По закінченні фільтрування апарат з'єднують з атмосферою за допомогою крану, кришку знімають і отриманий осад вивантажують вручну. На циліндричній частині деяких фільтрів є спеціальні ямки для вивантаження осаду.

Перевага друк- і нутч-фільтрів – простота конструкції, висока якість фільтрування; недолік -- мала продуктивність (мала поверхня фільтрування - 1-2 м²), ручне вивантаження осаду.

Значно більшу продуктивність (завдяки значно більшій площі поверхні фільтрування, до 100 м²) має рамний фільтр-прес (рис. 2.6 і 2.7), який працює під надлишковим тиском 0,3-0,8 МПа, що створюється насосом. Він складається з плит 1 і рам 2 квадратної, прямокутної або круглої форми, які стискаються між собою спеціальним пристроєм - затискувачем (ручним, електричним чи гідравлічним). Плити фільтра виготовляють із сталі, чавуну чи полімерних матеріалів Вони мають з обох боків рифлену поверхню, на яку вкладають фільтрувальну тканину 3. У зібраному вигляді між двома сусідніми плитами утворюються камери, в яких накопичується осад (Стасевич et al., 2018).

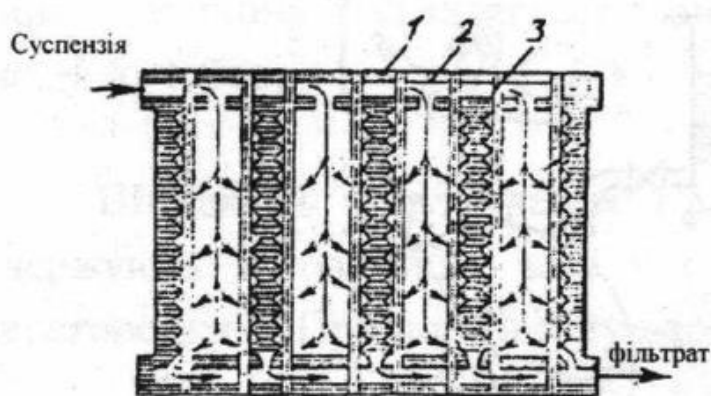


Рис. 5.6. Схема фільтрпреса (Стасевич et al., 2018).

У плитах, рамах і листах фільтрувальної тканини є отвори, які при збиранні фільтра утворюють канали для подачі суспензії та промивної рідини, а також для виведення фільтрату і промивного розчину. При фільтруванні суспензія подається паралельно в усі рами і по каналах у них витікає в простір між плитами. Через тканину, вкладену на плитах, проходить фільтрат, який потім стікає по рифленій поверхні плит до вивідного каналу і виводиться з фільтра.

Промисловість України виготовляє фільтри з європейськими типорозмірами плит 1200x1200 та 1500x1500 мм, які можуть мати глибину камер в плитах від 7,5 до 20 і більше мм, що відповідає товщині вивантажуваного осаду 15 - 40 і більше мм, наприклад рамний фільтр-прес РЗМ (рис. 5.7.).

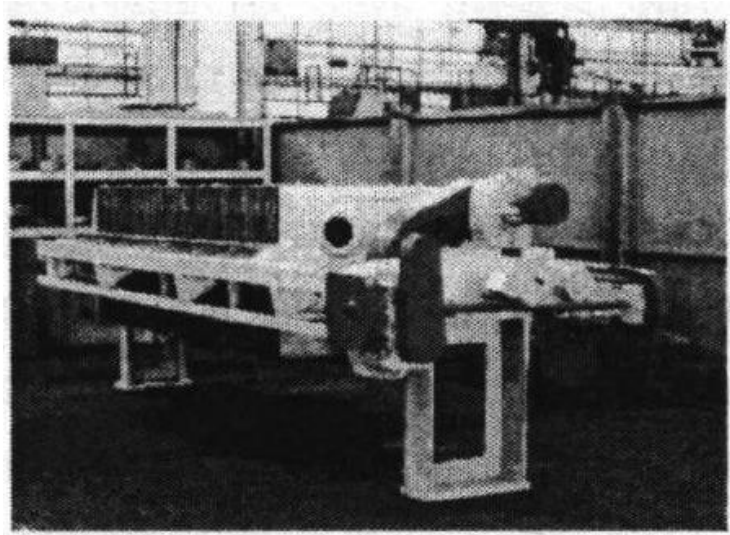


Рис. 5.7. Рамний фільтр-прес РЗМ (Стасевич et al., 2018).

Зменшення швидкості витікання фільтрату є ознакою заповнення рам осадом. Після закінчення процесу фільтрування осад часто промивають. При цьому через канал фільтрату можна подавати промивну рідину. Вона потрапляє в простір між плитою і фільтрувальною тканиною, проходить крізь шар осаду і виливається через верхній канал.

Перевага фільтр-пресів це: розвинута поверхня фільтрування, висока ступінь зневоднення, швидкість скидування коржа осаду, простота і надійність конструкції, широке використання (кислі, лужні і нейтральні суспензії) (Стасевич et al., 2018).

Але слід зауважити, що фільтрування за допомогою фільтрів періодичної дії пов'язане зі значними витратами праці та часу (до 30%) на допоміжні операції - промивання осаду на фільтрі та його вивантаження.

На відміну від фільтрів періодичної дії фільтри безперервної дії характеризуються більшою ефективністю та меншими втратами праці і часу.

Із фільтрів безперервної дії найбільше поширені барабанні, дискові та стрічкові вакуум-фільтри. Як приклад, на рис. 2.8 схематично зображено стрічковий вакуум-фільтр.

Фільтрувальна поверхня в ньому - це безперервна перфорована гумова стрічка з бортами 1, надіта на два барабани 2, які обертаються. Поверх стрічки знаходиться фільтрувальна тканина 6, для натягування якої слугують барабани 8.

Суспензія через лоток 3 і промивна рідина через форсунки (розпилювачі) 5 надходять на верхню частину стрічки фільтра. Завдяки цьому фільтрат і промивна вода відсмоктуються знизу гумової стрічки у вакуум-камери 4, а осад надходить у лоток 7 (Стасевич et al., 2018).

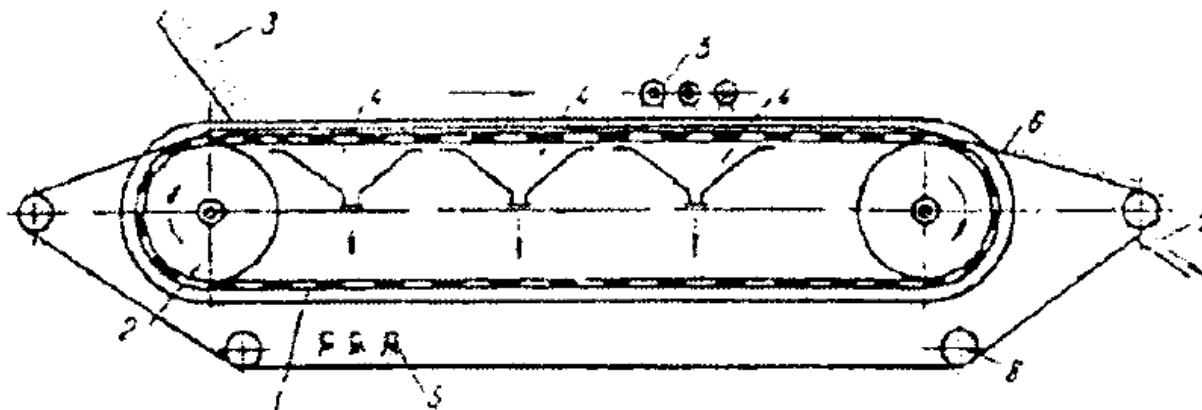


Рис. 5.8. Стрічковий вакуум-фільтр.

Вологість осаду після фільтрування складає 20-70%, в розрахунках зазвичай приймають 30% (Стасевич et al., 2018).

Отже, найкращим рішенням для збирання кристалів аскорбінової кислоти є використання стрічкового фільтра.

5.5. Висушування кристалів

Результати статті підтвердили, що ліофільна сушка є найкращою технікою зневоднення відносно кількісного збереження вітаміну С (Phan et al., 2021).

Цей метод сушіння ґрунтується на вакуумному вилученні вологи з матеріалу, який перебуває в замороженому стані; при цьому лід переходить у газовий стан, обминаючи рідкий. Більшу частину часу сушіння матеріал знаходиться за температури від -15 °до -55 °С. Оскільки процес відбувається за дуже низького тиску (50–150 Па), то на матеріал не діє не тільки тепло, але й кисень повітря. Завдяки цим перевагам ліофілізацію застосовують для сушіння термолабільних біологічно нестійких фармацевтичних субстанцій та інших продуктів мікробіологічного синтезу. Ліофільні установки (freeze-drying machine) технічно складні, потребують поєднання техніки глибокого вакууму та холодильної техніки і належать до вищого класу складності харчового й хімічного машинобудування (Сидоров, 2012).

Для висушування можна використати метод, описаний у статті (Rahman et al., 2015). Зразки заморожували в морозильній камері при $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ близько 24 годин. Заморожені кристали при температурі $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ сушили сублімацією при $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 96 годин за допомогою сублімаційної сушарки. У сушильній камері значення вакууму склала 200 Па, а температура конденсаційної пластини становила $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Rahman et al., 2015).

Після висушування кристали зберігають при відповідному температурному режимі та у підходящих умовах для подальшого виробництва готового продукту.

5.6. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

Вихідні дані:

- a. об'єм культуральної рідини з однієї ферментації - $V_{кр} = 3000 \text{ л} = 3 \text{ м}^3$;
- b. концентрація аскорбінової кислоти у КР $C_{ант} = 7,25 \text{ г/л} (=7,25 \text{ кг/м}^3)$
- c. концентрація біомаси у КР $C_{БМ} = 8,7 \text{ г/л} (= 8,7 \text{ кг/м}^3)$ – АСБ (Gutiérrez-Sánchez, Roussos, & Augur, 2013).

d. втрати на стадіях виділення аскорбінової кислоти - 30% (прийнято для розрахунку ТЕО):

1) початкова кількість цільового продукту, яка поступає з КР складає $3 \text{ м}^3 \times 7,25 \text{ кг/м}^3 = 21,75 \text{ кг}$;

2) кінцева кількість (з урахуванням 30% втрат) має становити 15,22кг

Розподіл втрат по стадіях та підбір необхідного обладнання наведено у таблиці 2.1.

Таблиця 5.1

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 30 %)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
Підготовка культуральної рідини						
1	Зберігання культуральної рідини	КР	3000 л	-	3000 л	Реактор для зберігання КР 5 м ³
Відділення біомаси						
2	Фільтрування культуральної рідини	Біомаса	26,1 (3 × 8,7) – з урахуванням 90% вологості 261 кг	-	-	Фільтр-прес конструкції серії ФПАКМ
		Фільтрат	2 739 л (3000-261)	136,95 л (5%)	2 602,05 л	- (на екстракцію)
Екстракція аскорбінової кислоти						
3	Рідинна екстракція аскорбінової кислоти	Фільтрат	2 602,05 л	-	-	Промисловий екстрактор

Продовження таблиці 5.1

1	2	3	4	5	6	7
		Екстрагент (160 г/л)	416,33 кг	-	-	- (подають зі складу)
		Екстракт аскорбінової кислоти (96%)	2 497,9 л	249,8 л (10%)	2 248,1 л	- (на кристалізацію)
Очищення та концентрування аскорбінової кислоти						
4	Кристалізація аскорбінової кислоти у вакуум-кристалізаторі	Екстракт аскорбінової кислоти (96%)	2 248,1 л	-	-	Вакуумний кристалізатор періодичної дії
		Кристалізована маса	2 248,1 кг	112,4 кг (5%)	2 135,7 кг	
Збирання кристалів						
5	Збирання кристалів фільтруванням	Кристалізована маса	2 135,7 кг	-	-	Стрічковий вакуум-фільтр
		Кристали аскорбінової кислоти (вологість 30%)	20,13 кг	1 кг (5%)	19,13 кг	- (передають на висушування)
		Маточний розчин	2 115,57 кг (2 135,7-20,13)	-	2 115,57 кг	- (на утилізацію)

Закінчення таблиці 5.1

1	2	3	4	5	6	7
Висушування кристалів						
6	Ліофільне висушування кристалів аскорбінової кислоти	Кристали аскорбінової кислоти (вологість 30%)	19,13 кг	-	-	Ліофільна сушарка
		Висушені кристали аскорбінової кислоти	15,98 кг	0,76 кг (5%)	15,22 кг	Збірник 20 л (передають на виробництво готового продукту)

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ
6.1 Специфікація обладнання для отримання субстанції аскорбінової
кислоти

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання для виділення аскорбінової кислоти

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
P-1	Реактор 5000 л	1	<p>Вертикальний реактор з полірованої нержавіючої сталі. Об'єм 5000 л. Внутрішній номінальний максимальний тиск 2 бар, максимальна внутрішня температура 130°C. Об'єм кожуха з нержавіючої сталі 247 літрів, максимальний тиск 2 бар і максимальна температура 90°C.</p> <p>Оснащений мішалкою.</p> <p>Компанія: «Nikro» (Словаччина)</p> <p>(https://perryvidex.eu/product/5000-ltr-2-bar-int-2-bar-jkt-110-agi316l-HG62398)</p>
H-2 H-5 H-7	Насос	3	<p>Фармацевтичний мембранний насос SANIBOXER 100.</p> <p>Продуктивність 7,2 м³ / год. Матеріал сталь AISI 316L. Тип насосу мембранний пневматичний.</p> <p>Максимальний тиск повітря 7 бар.</p> <p>Максимальна температура 95°C.</p> <p>Компанія: «DEBEM» (Італія)</p> <p>(https://bts.net.ua/ua/pumping-equipment-distillery/chemical-pumps/farmaceutichniy-membranniy-nasos-saniboxer-100/)</p>

Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата
Розробник		Ткаченко У.М.		
Керівник		Пирог Т.П.		
Н. контр				
Консульт				
Зав. Каф.		Стабніков В.П.		

НУХТ БТЕК 02.01.22 КР ПЗ

РОЗДІЛ 6. Специфікація
обладнання

Літера	Аркуш	Аркушів
	97	3
97		
Кафедра БТМ		

Продовження таблиці 6.1

Ф-3	Фільтр-прес конструкції серії ФПАКМ	1	<p>Фільтр-прес Hbracol. Фільтруюча площа 38,9 м². Робочий тиск до 8 бар. Робоча температура 110 °С.</p> <p>Компанія: «Pall» (США)</p> <p>(https://prom.ua/p4301349-filtr-press-hbracol.html?utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=KT_cpc_1_5297199152&gad_source=1&gclid=Cj0KCQjwlvW2BhDyARIsADnIe-K9UJUgcE2encWOdXqSZSgohpquR08C-UusumlOz6YWT1qFI5k4vhoaArQsEALw_wcB)</p>
Е-4	Екстрактор	1	<p>Промисловий екстрактор моделі GYC3000 об'ємом 3000 л, виготовлений з нержавіючої сталі 304. Оснащений цифровою системою керування дисплеєм. Циркуляційний насос охолоджуючої води , 20 тонн/год, охолоджуюча вода потрапляє через трубу в конденсатор.</p> <p>Компанія: «Shanghai Genyond Technology Co., Ltd.» (Китай) (https://genyang.en.made-in-china.com/product/XyxnPNAvCKVR/China-Factory-Genyond-Industrial-Big-Dydrosal-Essential-Oil-Extractor-Extraction-Equipment-Dsitillation-Machine-Distiller.html?pv_id=1i7bq6o2h4b1&faw_id=1i7bq7305def)</p>
ВК-6	Вакуумний кристалізатор	1	<p>Вакуумний горизонтальний статичний кристалізатор. Об'єм 4000 л, діаметр ємності 1300 мм, діаметр рубашки 1380 мм. Теплозберігаючий шар 60 мм.</p> <p>Компанія: «Zhang» (Китай)</p> <p>(https://www.zhanghua1976.com/Static-crystallizer/ss304-ss316-manufactured-vacuum-horizontal-static-crystallizer?_gl=1*ietsim*_up*MQ.&gclid=CjwKCAjwufq2BhAmEiwAnZqw8j0n6Ktsyg8kc8uSUBNCbLQVid2Kx26Vji56mBtkHoTz6nF7r2cLJR0CjKIQA_vD_BwE)</p>
СФ-8	Стрічковий фільтр	1	<p>Стрічковий вакуумний фільтр DU-12/1000. Площа фільтра 12 м². Ширина фільтра 1000 мм. Ступінь вакууму -0,06 МПа. Витрата вакууму 30 м³/хв.</p> <p>Компанія: «Shandong Hytec environmental equipment Co.,Ltd» (Китай)</p> <p>(https://en.sdhytec.com/product_detail/8.html)</p>

Закінчення таблиці 6.1

ЛС-9	Ліофільна сушарка	1	<p>Ліофільна сушарка Lyomax 3. Номінальна площа полиці (ручне завантаження) - 2,8 м². Діапазон відстаней між полицями 80-140 мм. Розмір полиці 615 x 915 мм. Обсяг конденсатора 67 кг при 12,7 мм льоду. Потужність вакуумного насоса 1 x 40 м³/год. Компанія: «ІМА S.p.A.» (Італія) (https://ima.it/pharma/machine/lyomax/)</p>
З-10	Збірник 20 л	1	<p>Вертикальний резервуар з нержавіючої сталі об'ємом 20 л. Внутрішній діаметр 265 мм, довжина прямої сторони 365 мм. Дно конічне з центральним випускним отвором. Верх оснащений кришкою з нержавіючої сталі. Компанія: «Perry Videx LLC» (Польща) https://perryvidex.eu/product/20-ltr-265-mm-x-365-mm-v-storage-U2402-18-U2402-19</p>

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОТРИМАННЯ СУБСТАНЦІЇ АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ

ТП 1. Підготовка культуральної рідини

ТП 1.1. Зберігання культуральної рідини

Культуральну рідину після виробничого біосинтезу аскорбінової кислоти промисловим насосом з ферментера перекачують до реактора Р-1 об'ємом 5000 л. Культуральну рідину зберігають у реакторі Р-1 при температурі 20-22°C та перемішуванні 50 об/хв. Для виділення та очищення аскорбінової кислоти культуральну рідину за допомогою мембранного насоса Н-2 подають з реактора Р-1 до ТП 2.1.

ТП 2. Відділення біомаси

ТП 2.1. Фільтрування культуральної рідини

Насосом Н-2 культуральна рідина з реактора Р-1 (від ТП 1.1) перекачується на фільтр-прес конструкції серії ФПАКМ Ф-3, фільтруюча площа становить 38,9 м². Здійснюють фільтрування культуральної рідини в повному обсязі при робочому тиску 8 бар.

По закінченню фільтрування біомасу продуцента аскорбінової кислоти подають на утилізацію. Отриманий фільтрат з фільтра Ф-3 надходить на наступну стадію екстракції аскорбінової кислоти до ТП 3.1.

					НУХТ БТЕК 02.01.22 КР ПЗ			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 7. Опис Технологічної схеми отримання субстанції аскорбінової кислоти	<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробник</i>	<i>Ткаченко У.М.</i>						100	3
<i>Керівник</i>	<i>Пирог Т.П.</i>							
<i>Н. контр</i>								
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. Каф.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>					100	Кафедра БТМ	

ТП 3. Екстракція аскорбінової кислоти

ТП 3.1. Рідинна екстракція аскорбінової кислоти

Отриманий фільтрат від *ТП 2.1* надходить до промислового екстрактора Е-4 моделі GYC3000 об'ємом 3000 л. Екстрактор вмикають та подають екстрагент - розчин смоли Amberlite LA-2 в бутилацетаті, концентрація екстрагенту 160 г/л. Процес екстракції здійснюють до кінцевої концентрації аскорбінової кислоти 96%.

Після закінчення екстракції нативний розчин насосом Н-5 перекачують до кристалізатора на стадію *ТП 4.1*.

ТП 4. Очищення та концентрування аскорбінової кислоти

ТП 4.1. Кристалізація аскорбінової кислоти у вакуум-кристалізаторі

Нативний розчин насосом Н-5 перекачують з промислового екстрактора Е-4 до вакуумного кристалізатора ВК-6. Вмикають кристалізатор, після чого вмикають перемішуючий пристрій. Тиск підтримується на рівні 0,06 бар. Під час кристалізації температура в кристалізаторі може коливатися в межах 30-50 °С. Оскільки в процесі використовується пара температурою 100 °С для нагрівання рубашки, це дозволяє підтримувати оптимальні умови для кристалізації без перегріву самої аскорбінової кислоти, завдяки цьому в кристалізаторі створюється вакуум. Здійснюють кристалізацію до повної кристалізації нативного розчину аскорбінової кислоти.

По закінченню процесу вмикають подачу гарячої пари в рубашку апарата, в апараті вирівнюють тиск до атмосферного та охолоджують кристалізовану масу аскорбінової кислоти. Відпрацьоване повітря очищують та утилізують.

Одержану кристалізовану масу за допомогою насоса Н-7 подають далі на стадію збирання кристалів *ТП 5.1*.

ТП 5. Збирання кристалів

ТП 5.1. Збирання кристалів фільтруванням

Одержану кристалізовану масу за допомогою насоса Н-7 перекачують з кристалізатора ВК-6 до стрічкового фільтра СФ-8 для фільтрування. Площа фільтра становить 12 м². Процес здійснюють до закінчення фільтрування всього обсягу кристалізованої маси та отримання кристалів.

Після завершення фільтрування відділені кристали аскорбінової кислоти вручну вивантажують з фільтра СФ-8 та передають на ліофільне висушування до *ТП 6.1.*

ТП 6. Висушування кристалів

ТП 6.1. Ліофільне висушування кристалів аскорбінової кислоти

Одержані кристали аскорбінової кислоти від *ТП 5.1* надходять до ліофільної сушарки ЛС-9.

Кристали вручну завантажують на полиці ліофільної сушарки та вмикають сушарку. Кристали попередньо заморожують при температурі -40°C упродовж близько 24 годин в камері ліофільної сушарки ЛС-9. Заморожені кристали висушують сублімацією за температури 20°C протягом 96 годин.

Після 96 годин висушування вимикають апарат, вивантажують висушену кристалічну субстанцію аскорбінової кислоти та вручну поміщають до збірника З-10 об'ємом 20 л. Після цього аскорбінова кислота надходить на проміжний контроль основних показників якості субстанції, а після цього - на стадії одержання готового продукту.

РОЗДІЛ 8. ТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ ГОТОВОЇ КІНЦЕВОЇ ФОРМИ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

8.1. Обґрунтування вибору товарної форми випуску цільового продукту мікробного синтезу (форми випуску продукту та вибір упаковки).

Аскорбінова кислота, відома також як вітамін С, широко використовується в харчовій промисловості, зокрема як добавка в хліб та інші продукти. Її роль як поліпшувача якості хліба стала предметом численних досліджень, які виявили механізми дії цього важливого компонента. У борошні присутня окиснювально-відновна ферментна система, що включає оксидазу аскорбінової кислоти та редуктазу дегідроаскорбінової кислоти. Додавання аскорбінової кислоти до тіста активує ці ферменти, що призводить до окислення аскорбінової кислоти та утворення дегідро-L-аскорбінової кислоти. Цей процес покращує структурно-механічні властивості тіста, його газо- і формоутримуючу здатність, в результаті чого збільшується об'єм хліба та зменшується розпливчастість його сортів (Лук'яненко, & Зубарева, 2023). Вона допомагає прискорити процес формування тіста, якщо її додають у тісто під час приготування хліба (Bede et al., 2021).

Борошно несприйнятливим до надмірної обробки аскорбінової кислоти. На рівні від 70 до 100 ppm, аскорбінова кислота сприяє гарному розвитку тіста при звичайній швидкості перемішування і покращує якість хліба за рахунок утворення більшої пекарської пружини, що призводить до більш дрібного зерна м'якушки і більшого об'єму буханця. У випадку з механічною системою розпушування тіста регулярно використовується 75 ppm.

					НУХТ БТЕК 02.01.22 КР ПЗ			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 8. Технологічні особливості отримання готової кінцевої форми цільового продукту	<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробник</i>	<i>Ткаченко У.М.</i>						103	7
<i>Керівник</i>	<i>Пирог Т.П.</i>					Кафедра БТМ		
<i>Н. контр</i>								
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. Каф.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>							

Перевагою аскорбінової кислоти є те, що його надмірний вміст не є шкідливим для тіста (до 200 ppm), тому що кількість кисню, необхідна для його дії є граничною. Коли додається занадто багато аскорбінової кислоти, тісто не піддається деформації під час формування і може розриватися під час вистоювання через недостатньої розтяжності. Хліб, виготовлений з такого хліб з такого тіста має невеликий об'єм буханця з грубою скоринкою. Його м'якушка має багато розірваних комірок і може мати великі дірки (Hrušková, & Novotna, 2003). Аскорбінова кислота як поліпшувач тіста і хліба вигідно відрізняється від інших окисників практичною відсутністю негативного впливу на якість хліба, добавок, що перевищують величину оптимального дозування. Таким чином, створення функціональних хлібобулочних виробів, які містять добавки вітаміну С, є актуальним біотехнологічним напрямком.

У цьому звіті розглядається обґрунтування вибору форми випуску аскорбінової кислоти для виробництва хліба, а також необхідні умови виробництва та упаковки.

8.2. Вибір форми випуску аскорбінової кислоти

Оскільки кінцевий етап одержання аскорбінової кислоти (E300) в нашій технологічній схемі передбачає очищення та стабілізацію, форма випуску безпосередньо залежить від цих процесів. Очищення аскорбінової кислоти передбачає отримання продукту у порошковій або гранульованій формі, що забезпечує зручність у використанні та тривалість зберігання. Враховуючи специфіку цієї харчової добавки, а також необхідність збереження її антиоксидантних властивостей, найбільш доцільною формою випуску є порошок або гранули. Ця форма забезпечує стабільність аскорбінової кислоти та легкість у подальшому використанні в різних харчових продуктах. Аскорбінова кислота є чутливою до світла, тепла і вологості. Порошкова форма забезпечує кращу стабільність, оскільки зменшує ризик деградації під впливом навколишнього середовища.

8.3 Вибір упаковки

Упаковка повинна забезпечувати захист від вологи, світла та механічних пошкоджень. Рекомендуються: пластикові контейнери: легкі, герметичні, з можливістю повторного використання або алюмінієві пакети: захищають від світла та кисню.

Оптимальними обсягами упаковки для харчової добавки E300 є від 50- 300 г - ці обсяги дозволяють легко відміряти потрібну кількість добавки для виробництва різних продуктів.

Виробництво аскорбінової кислоти (E300) є важливим етапом у створенні багатьох харчових продуктів. Для забезпечення високої якості та безпеки цієї харчової добавки необхідно дотримуватись строгих стандартів чистоти та умов виробництва відповідно до принципів добрих виробничих практик (GMP). Обрана форма випуску — порошок або гранули. Ця форма забезпечує легке дозування(легко дозується та змішується з борошном або іншими інгредієнтами), високу стабільність(порошок можна зберігати в герметичних упаковках, що знижує ризик окислення) і економічність (порошкова форма зазвичай дешевша у виробництві та транспортуванні).

8.4 Обладнання яке може використовуватись для фасування аскорбінової кислоти(E300)

Фасування аскорбінової кислоти в алюмінієві пакети є необхідним процесом для збереження її властивостей та зручності використання. Алюмінієва упаковка забезпечує надійний захист від вологи та світла, що дозволяє зберегти активність вітаміну на тривалий час.

Ми можемо використовувати обладнання «Апарат для фасування сипких продуктів «Техноваги»».

Обладнання для фасування сипучих продуктів, яке має продуктивність 20-45 пакетів на хвилину, є ідеальним вибором для фасування аскорбінової кислоти в алюмінієві пакети з масою 300 г, тому що обладнання забезпечує об'ємне дозування з допустимим відхиленням маси дози $\pm 3\%$. Це гарантує, що кожен пакет міститиме

точно 300 г аскорбінової кислоти; універсальність упаковки: розміри плоского пакета (ширина 100-175 мм, висота 100-300 мм) дозволяють використовувати різні формати упаковки; використання багатошарової плівки на лавсановій основі та інших термозварювальних плівок гарантує надійний захист аскорбінової кислоти від зовнішніх факторів, таких як волога та світло (<https://technowagy.com.ua/products/avtomat-dlya-upakovki-sypuchih-produktov-do-1-kg/>).

Технологічна схема процесу пакування сипкого продукту або дрібноштучних виробів насипом в фасувальній машині з вертикальним пакетоформувавцем включає кілька етапів:

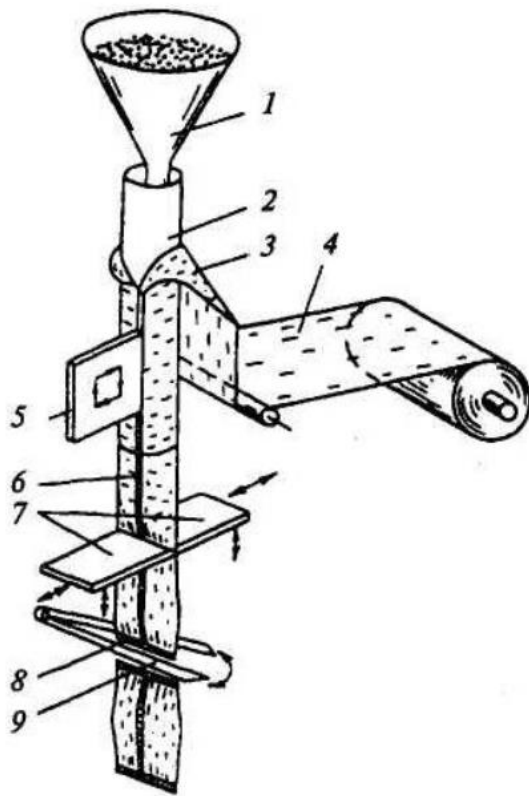


Рис. 8.1. Технологічна схема процесу пакування сипкого продукту або дрібноштучних виробів насипом в фасувальній машині з вертикальним пакетоформувавцем

(https://elib.lntu.edu.ua/sites/default/files/elib_upload/%D0%9F%D0%BE%D1%81%D1%96%D0%B1%20%D0%A1%D0%B0%D0%B9/page18.html).

На рис. 8.1. зображено, як відміряна доза продукту або виробів завантажується приймальну воронку 1 і подається в формуючий циліндр 2

пакетоформувача. Одночасно стрічка пакувального матеріалу 4, яка заправлена між вертикальною направляючою 3 і формуючим циліндром 2, при протягуванні вниз звертається підгиначами в трубку. Утворений при цьому поздовжній шов притискується і прогрівається вертикальним електронагрівачем 5 до температури 120...130°C. В результаті цього відбувається термічне зварювання поздовжнього шва 6.

Далі трубка пакувального матеріалу притискується горизонтальними губками 7 механізму протягування. В утворений пакет зверху подається виміряна доза сипкого продукту або дрібноштучних виробів. В губках 7 змонтовані нагрівальні елементи, які зварюють пакувальний матеріал з утворенням поперечного шва.

Заповнений продуктом пакет відрізається ножицями 9 посередині шва 8 і готові пакети з продуктом поступають на розвантажувальний лоток машини (https://elib.lntu.edu.ua/sites/default/files/elib_upload/%D0%9F%D0%BE%D1%81%D1%96%D0%B1%20%D0%A1%D0%B0%D0%B9/page18.html).

Таким чином, автомат для пакування сипучих продуктів до 1 кг є оптимальним вибором для фасування аскорбінової кислоти в алюмінієві пакети завдяки своїй точності, надійності та простоті в експлуатації.

8.5. Класи чистоти

Виробництво аскорбінової кислоти також є важливим процесом, що вимагає дотримання високих стандартів чистоти для забезпечення якості кінцевого продукту. Відповідно до принципів добрих виробничих практик (GMP, Good Manufacturing Practice), процес виробництва аскорбінової кислоти може відбуватися в умовах класу чистоти С або D.

Ці класи чистоти забезпечують необхідний рівень контролю за забрудненнями та мікробіологічними показниками, що є критично важливим для безпеки та ефективності продукту. Хоча умови класу С або D можуть бути менш строгими, ніж у класах А або В, вони все ще гарантують, що виробничі процеси проводяться в контрольованому середовищі, що відповідає вимогам до якості.

Таким чином, дотримання цих стандартів сприяє виробництву аскорбінової кислоти, яка відповідає вимогам споживачів і стандартам безпеки.

Клас чистоти С

Приміщення класу С забезпечують середній рівень чистоти, який підходить для виробничих процесів, де контроль забруднень є важливим, але не критичним. Це приміщення можуть використовуватися для етапів виробництва аскорбінової кислоти, де ризик забруднення менший. Основні характеристики включають:

1. Ефективність очищення повітря - у класі С очищення повітря здійснюється за тріступінчатою системою з використанням вискоефективних фільтрів: 1 рівень: не нижче класу G4, 2 рівень: не нижче класу F7, 3 рівень: не нижче класу H12

2. Фільтрація - Клас С має значно нижчу максимально допустиму кількість часток у повітрі: 350,000 часток розміром від 0.5 до 5 мкм та 2,000 часток більше 5 мкм.

3. Контроль мікроклімату: Клас С має чітко визначені вимоги до температури (21 ± 2 °C взимку та 23 ± 2 °C влітку) і вологості (30-50%)

Клас чистоти D

Приміщення класу D мають найнижчий рівень чистоти з усіх згаданих класів. Вони можуть використовуватися для етапів виробництва, де контроль за забрудненнями менш критичний. Основні характеристики включають:

1. Ефективність очищення повітря - у класі D очищення повітря здійснюється за тріступінчатою системою, де фільтри на кожному рівні мають нижчі стандарти: 1 рівень: не нижче класу G3, 2 рівень: не нижче класу F6, 3 рівень: не нижче класу H11.

2. Фільтрація- У класі D показники: 3,500,000 часток від 0.5 до 5 мкм і 20,000 більше 5 мкм.

1. Контроль мікроклімату: Температура та вологість контролюються, але допускаються більші коливання. Температура може варіюватися від 20 до 25 °C, а вологість — 50-70%

(https://zakononline.com.ua/documents/show/41907___487517). Клас чистоти С є кращим вибором для виробництва аскорбінової кислоти в порівнянні з класом D з кількох ключових причин. По-перше, клас С забезпечує більш високий рівень очищення повітря завдяки використанню вискоелективних фільтрів. Це значно знижує ризик забруднення продукції.

По-друге, контроль мікроклімату в класі С є більш суворим: температура і вологість мають чітко визначені межі, що забезпечує стабільні умови для виробництва. Таким чином, завдяки кращій ефективності очищення повітря та строгішому контролю мікроклімату, клас чистоти С є більш придатним для процесів виробництва аскорбінової кислоти, де чистота і контроль забруднень мають критичне значення для якості кінцевого продукту.

Додаткові умови для класу С при виробництві аскорбінової кислоти

1. Суворий контроль за персоналом: усі працівники, які працюють у приміщеннях класу С, повинні проходити обов'язкове навчання з гігієни та безпеки, персонал зобов'язаний носити спеціальний одяг, включаючи стерильні халати, рукавички, маски та головні убори, щоб зменшити ризик контамінації продуктів.

2. Контроль за матеріалами: усі матеріали, що використовуються у виробництві аскорбінової кислоти, повинні бути стерильними та відповідати вимогам якості.

3. Регулярні перевірки: проводяться регулярні внутрішні та зовнішні аудити для перевірки дотримання стандартів GMP (Good Manufacturing Practice).

РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ

1. Зовнішній вигляд

Визначають візуально. Кристали або порошок без запаху від білого до світло-жовтого кольору (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ascorbic-Acid#section=Physical-Description>).

2. Розчинність

Розчиняється у воді (1:3,5), пропіленгліколі (1:20), 95% етанолі (1:25), гліцерині (1:1000); практично не розчиняється в хлороформі, етері та жирних маслах; несумісна з лугами, іонами важких металів (особливо купрумом та ферумом), окисниками, мефенаміном, фенілефрину гідрохлоридом, піриламін малеатом, саліциламідом, натрію нітритом, натрію саліцилатом та теобромін саліцилатом (<https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3492/kislota-askorbinova#:~:text=%D0%92%D0%BB%D0%B0%D1%81%D1%82%D0%B8%D0%B2%D0%BE%D1%81%D1%82%D1%96%3A%20%D1%80%D0%9D%20%2C1%E2%80%93%2C57%3B%20T%D0%BF%D0%BB%20.%3D>).

					НУХТ БТЕК 02.01.22 КР ПЗ			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 9.Контроль виробництва субстанції аскорбінової кислоти	<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробник</i>	<i>Ткаченко У.М.</i>						110	4
<i>Керівник</i>	<i>Пирог Т.П.</i>							110
<i>Н. контр</i>						Кафедра БТМ		
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. Каф.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>							

3. Визначення рН

Готують 5% розчин аскорбінової кислоти у дистильованій воді. У колбу на 100 мл вносять наважку 5 г аскорбінової кислоти, доводять до мітки дистильованою водою. Ретельно перемішують до повного розчинення.

Проводять вимірювання рН за допомогою відкаліброваного рН-метра.

Значення рН 5% водного розчину має бути в межах 2,1–2,6 (<https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3492/kislota-askorbinova#:~:text=%D0%92%D0%BB%D0%B0%D1%81%D1%82%D0%B8%D0%B2%D0%BE%D1%81%D1%82%D1%96%3A%20%D1%80%D0%9D%20%2C1%E2%80%93,%2C57%3B%20T%D0%BF%D0%BB%20.%3D>).

4. Визначення питомого оптичного обертання

При кімнатній температурі аскорбінову кислоту розчиняють у дистильованій воді, готуючи розчин концентрацією 120 г/л. Цей безбарвний базовий розчин використовують свіжоприготований (Linthorst, & Wal-Veuger, 2014).

У кілька колб піпеткою додають 20,00 мл цього розчину. Потім 5,00 мл HCl (4 М) або NaOH (4 М чи 6 М) додають в кожну колбу з дистильованою водою в різних співвідношеннях. Таким чином отримують серії розчинів вітаміну С (96 г/л) з різними значеннями рН.

Після цього оптичну активність розчинів визначають при температурі 20°C за допомогою D-лінії натрію при довжині хвилі 589,3 нм. Для цього підходить дисковий поляриметр Novex 99.400 Euromex Holland.

Питоме оптичне обертання L-аскорбінової кислоти (10 мг/мл) при кімнатній температурі 24±1°C становить +28, підтверджуючи її стереохімічну чистоту (Linthorst, & Wal-Veuger, 2014).

5. Якісні реакції

Фармакопейні реакції : До розчину кислоти аскорбінової додають кислоту нітратну розведену та розчин аргентуму нітрату - випадає сірий осад металічного аргентуму.

Нефармакопейні реакції:

а) при додаванні до розчину кислоти аскорбінової по краплях розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу його синє забарвлення зникає.

б) Кислота аскорбінова з феруму (II) сульфатом у присутності натрію гідрокарбонату утворює феруму аскорбінат, забарвлений у фіолетовий колір.

6. Кількісне визначення

Кількісне визначення вітаміну С (аскорбінової кислоти) можна провести за методом Тильманса (Гребіник, Моргаєнко, & Скопенко, 2009).

Принцип методу.

Метод ґрунтується на здатності аскорбінової кислоти окислюватися 2,6-дихлорфеноліндофенолом до дегідроаскорбінової кислоти. За кількістю 2,6-дихлорфеноліндофенолу, витраченого для титрування, визначають кількість аскорбінової кислоти в досліджуваному матеріалі. Коли весь вітамін С окислиться, розчин, що титрується, набуде рожевого кольору за рахунок утворення недисоціюючих молекул 2,6-дихлорфеноліндофенолу (у кислому середовищі). У лужному середовищі 2,6-дихлорфеноліндофенол має синє забарвлення, у кислому — червоне, а після відновлення знебарвлюється.

Матеріали та реактиви.

Соляна кислота (2 %-й розчин), натрієва сіль 2,6-дихлорфеноліндофенолу (0,0005 моль/л розчин, молекулярна маса — 290, грам-еквівалент—145), дослідний зразок.

Обладнання.

Фарфорова ступка з пестиком, колби, мікробюретка, склянка для титрування, піпетки, лійка, ваги.

Хід роботи.

У фарфоровій ступці ретельно розтирають 1 г дослідного матеріалу. До розтертої маси додають 9 мл розчину соляної кислоти, відстоюють і через 10 хв фільтрують. Для кількісного визначення беруть 3 мл фільтрату, вносять у колби й титрують розчином 2,6-дихлорфеноліндофенолу до появи рожевого забарвлення, яке зберігається протягом 30 сек.

Обробка результатів.

1 мл 0,0005 моль/л розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу відповідає 0,088 мг аскорбінової кислоти. Масову концентрацію аскорбінової кислоти, мг, розраховують за формулою

$$C = \frac{QAV_0}{V_1a},$$

де: Q - кількість аскорбінової кислоти (0,088 мг), яка відповідає 1 мл 0,0005 моль/л розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу, A – кількість 0,0005 моль/л розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу, витрачена на титрування, мл, V_0 – загальна кількість екстракту, мл, V_1 – об'єм екстракту, взятий для титрування, мл, a – маса дослідного біологічного матеріалу, г (Гребіник, Моргаєнко, & Скопенко, 2009).

ВИСНОВКИ

1. Здійснено огляд літератури на тему інтегрованих мікробних технологій. Основний масив інформації стосується співсинтезу з супутніми продуктами полігідроксиалканоатів, амінокислот, біотрансформації дешевих і доступних целюлозовмісних субстратів у спирти або органічні кислоти, а також отриманню комплексних препаратів поверхнево-активних речовин і фітогормонів;

2. Обґрунтовано вибір біологічного агента для одержання аскорбінової кислоти є рекомбінантний штам F3, отриманий злиттям протопластів *A. flavus* і *A. tamari* (номери штамів не вказано), зважаючи на синтез вітаміну С у високій концентрації на оптимальному середовищі з відходами пивоварного виробництва. Оптимальний рівень синтезу аскорбінової кислоти 7,25 г/л був отриманий *Aspergillus tamaris* (штам не вказано) протягом 96 годин культивування . Розраховано річну потребу в аскорбіновій кислоті як харчової добавки для виробництва хліба яка становить 491,9 кг.

3. Обґрунтовано технологічну схему етапів виділення та очищення. Здійснено підбір технологічного обладнання. Кінцева кількість (з урахуванням 30% втрат) має становити 15,22кг

4. Обґрунтування вибору товарної форми випуску цільового продукту.

					НУХТ БТЕК 02.01.22 КР ПЗ		
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	ВИСНОВОК		
Розробник	Ткаченко У.М.						
Керівник	Пирог Т.П.						
Н. контр							
Консульт							
Зав. Каф.	Стабніков В.П.				Літера	Аркуш	Аркушів
						113	1
					113		
					Кафедра БТМ		

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Гіріч, Т. Ю., Єльцова, Т. П., Рябік, П. В. (2010). Конспект лекцій з курсу "Основні процеси та апарати хімічної технології". Розділ "КРИСТАЛІЗАЦІЯ" для студентів усіх спеціальностей. Дніпропетровськ: ДВНЗ УДХТУ, 26.
2. Головей, О. П., Гуляєв, В. М. (2017). Асептика біотехнологічних виробництв. Головей ОП, Гуляєв ВМ—Камянське, 140.
3. Гребіник, Д. М., Моргаєнко, О. О., Скопенко, О. В. (2009). Лабораторний практикум з курсу "Біохімія" для студентів заочного відділення. Київ, 23.
4. Гуляєв, В. М. (2019). Устаткування виробництва. Кам'янське: ДДТУ, 58.
5. Дробот, В. І. (2002). Технологія хлібопекарського виробництва. К.: Логос, 368.
6. Карлаш, Ю. В., Красінько, В. О. (2022). Основи проєктування біотехнологічних виробництв.
7. Кравченко О. О., Савчук О. М., Остапченко Л. І. Загальна біотехнологія: навчальний посібник / О. О. Кравченко, О. М. Савчук, Л. І. Остапченко. – К.: ВПЦ "Київський університет", 2019. – 269 с.
8. Лисицкая, С. М., Горова, А. І. (2021). Біотехнологія. Методичні рекомендації до виконання в дистанційному режимі контрольних і тестових завдань з дисциплін «Біотехнологія», «Основи промислової біотехнології» студентами спеціальності 161 «Хімічні технології та інженерія».
9. Лук'яненко, Д. Р., Зубарева, І. М. ВІТАМІН С ЯК ПОЛІПШУВАЧ ДЛЯ ХЛІБОБУЛОЧНИХ ПРОДУКТІВ. ЗБІРНИК НАУКОВИХ МАТЕРІАЛІВ LXVI МІЖНАРОДНОЇ НАУКОВО-ПРАКТИЧНОЇ ІНТЕРНЕТ-КОНФЕРЕНЦІЇ, 154.
10. Махинько, В. М., Махинько, Л. В. (2010). Норми споживання хліба в різних країнах з погляду задоволення основних потреб організму.

11. Міхедькіна, О. Й., Ларіна, Г. І., Мельник, І. І., Циганков, О. В. (2023). Методичні вказівки до лабораторних робіт і самостійної роботи за темою "Методи очищення та виділення органічних речовин" з навчальної дисципліни "Органічна хімія".
12. Сидоров, Ю. І. (2012). Лабораторні та пілотні ліофільні сушарки періодичної дії в біотехнології. *Biotechnology*, (5, № 5), 9-15.
13. Стасевич, М. В., Милянч, А. О., Стрельников, Л. С., Крутський, Т. В., Бучкевич, І. Р., Зайцев, О. І., ... Новіков, В. П. (2017). Технологічне обладнання біотехнологічної і фармацевтичної промисловості. Львів: Новий світ-2000, 410.
14. Abd, Amr & El-Banna, El-Rhman & Mohamed, Amal & El-Razek, Abd & El-Mahdy, Ahmed. (2012). Isolation, Identification and Screening of Carotenoid-Producing Strains of *Rhodotorula glutinis*. *Food and Nutrition Sciences*. 03. 10.4236/fns.2012.35086.
15. Abdenacer, M., Aicha, N., Joseph, B., & Nabil, N. (2021). High production of L-glutamic acid from date juice extracts by using fed-batch cultures: pulsed and continuous feeding modes. *Acta Scientifica Naturalis*, 8(1), 37-50.
16. Adeoye, A. O., & Lateef, A. (2021). Biotechnological valorization of cashew apple juice for the production of citric acid by a local strain of *Aspergillus niger* LCFS 5. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 1-10.
17. Ahmad, Z. S., & Munaim, M. S. A. (2018). Effect of time, moisture content, and substrate amount on sorbitol production using entrapment of *Lactobacillus plantarum* (BAA-793) in sodium alginate beads. *Food bioscience*, 21, 27-33.
18. Ahmadi, N., Khosravi-Darani, K., & Mortazavian, A. M. (2017). An overview of biotechnological production of propionic acid: From upstream to downstream processes. *Electronic Journal of Biotechnology*, 28, 67-75.
19. Ahmadi, N., Khosravi-Darani, K., Mohammad Mortazavian, A., & Mashayekh, S. M. (2017). Effects of process variables on fed-batch production of propionic acid. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(2), e12853.

20. Ahmed, A. S., Farag, S. S., Hassan, I. A., & Botros, H. W. (2015). Production of gluconic acid by using some irradiated microorganisms. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 8(3), 374-380.
21. Ajala, E. O., Ajala, M. A., Ogunniyi, D. S., & Sunmonu, M. O. (2016). Kinetics of gluconic acid production and cell growth in a batch bioreactor by *Aspergillus niger* using breadfruit hydrolysate. *Journal of Food Process Engineering*, 40(3), e12461. doi:10.1111/jfpe.12461
22. Alharbi, N. S., Kadaikunnan, S., Khaled, J. M., Almanaa, T. N., Innasimuthu, G. M., Rajoo, B., ... & Rajaram, S. K. (2020). Optimization of glutamic acid production by *Corynebacterium glutamicum* using response surface methodology. *Journal of King Saud University-Science*, 32(2), 1403-1408.
23. Almanaa, T. N., Vijayaraghavan, P., Alharbi, N. S., Kadaikunnan, S., Khaled, J. M., & Alyahya, S. A. (2020). Solid state fermentation of amylase production from *Bacillus subtilis* D19 using agro-residues. *Journal of King Saud University-Science*, 32(2), 1555-1561.
24. Amado, I. R., & Vázquez, J. A. (2015). Mussel processing wastewater: a low-cost substrate for the production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Microbial Cell Factories*, 14(1). doi:10.1186/s12934-015-0375-5
25. An, C., Ma, S. J., Chang, F., & Xue, W. J. (2017). Efficient production of pullulan by *Aureobasidium pullulans* grown on mixtures of potato starch hydrolysate and sucrose. *Brazilian journal of microbiology*, 48, 180-185.
26. Anane, R. F., Sun, H., Zhao, L., Wang, L., Lin, C., & Mao, Z. (2017). Improved curdlan production with discarded bottom parts of *Asparagus spear*. *Microbial cell factories*, 16(1), 1-8.
27. Ariana, M., & Hamedi, J. (2017). Enhanced production of nisin by co-culture of *Lactococcus lactis* sub sp. *lactis* and *Yarrowia lipolytica* in molasses based medium. *Journal of biotechnology*, 256, 21-26. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.07.009>

28. Awulachew, Melaku. (2021). Food Additives and Food Processing Aids: The Role, Function And Future Research Need of Industrial Food Biotechnology. 73-82.
29. Bacterial strain used for producing calcium lactate by fermenting cane molasses, and fermentation method: pat. CN102888352B China; заявл. 16.07.2012; опубли. 23.01.2013, 5 с.
30. Banerjee, S., Kumar, R., & Pal, P. (2018). Fermentative production of gluconic acid: A membrane-integrated Green process. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 84, 76-84.
31. Banjo, T., Kareem, S., Akinduti, P., Popoola, T., & Akinloye, O. (2019). Optimization and production of ascorbic acid by fusant cell of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. *Journal of King Saud University-Science*, 31(4), 931-936. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.04.032>
32. Banjo, T. T., Kareem, S. O., Popoola, T. O., & Akinloye, O. A. (2018). Microbial production of ascorbic acid from brewery spent grain (BSG) by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. *Food and Applied Bioscience Journal*, 6(2), 93-105. <https://doi.org/10.14456/fabj.2018.9>
33. Baratto, Cesar & Becker, Natalia & Neves Gelinski, Jane Mary & Silveira, Sydney. (2015). Influence of enzymes and ascorbic acid on dough rheology and wheat bread quality. *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*. 14. 3124-3130. 10.5897/AJB2015.14931.
34. Bashir, S., Bashir, R., Pervaiz, M., Adnan, A., Al-Qahtani, W. H., & Sillanpaa, M. (2022). RSM-based optimization of fermentation conditions and kinetic studies of glutamic acid and lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Nanomaterials*, 2022.
35. Bede, E. N., Ihediohanma, N. C., Ngobidi, P. C., & Onuegbu, N. C. (2021). The Effect of Ascorbic Acid on the Physical and Proximate Properties of Wheat-Acha Composite Bread. *European Journal of Nutrition & Food Safety*, 13(1), 93-100.

36. Blaga, Alexandra & Dragoi, Elena & Gal, Diana & Puitel, Adrian & Tucaliuc, Alexandra & Kloetzer, Lenuta & Cascaval, Dan & Galaction, Anca-Irina. (2023). Selective Separation Of Vitamin C By Reactive Extraction USING Ionic Liquid: Experimental And Modelling. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 133. 10.1016/j.jiec.2023.11.057.
37. Carly, F., Vandermies, M., Telek, S., Steels, S., Thomas, S., Nicaud, J. M., & Fickers, P. (2017). Enhancing erythritol productivity in *Yarrowia lipolytica* using metabolic engineering. *Metabolic engineering*, 42, 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.05.002>
38. Carneiro, C. V. G., Silva, F. C. D. P. E., & Almeida, J. R. (2019). Xylitol production: identification and comparison of new producing yeasts. *Microorganisms*, 7(11), 484.
39. Chand Bhalla, T., Bansuli, Thakur, N., Savitri, & Thakur, N. (2017). Invertase of *Saccharomyces cerevisiae* SAA-612: Production, characterization and application in synthesis of fructo-oligosaccharides. *LWT*, 77, 178–185. doi:10.1016/j.lwt.2016.11.034
40. Chen, G., Wang, J., Su, Y., Zhu, Y., Zhang, G., Zhao, H., Liu, H., Yang, Y., Nian, R., Zhang, H., Wei, Y., & Xian, M. (2017). Pullulan production from synthetic medium by a new mutant of *Aureobasidium pullulans*. *Preparative biochemistry & biotechnology*, 47(10), 963–969. <https://doi.org/10.1080/10826068.2017.1350979>
41. Chen, G., Zhu, Y., Zhang, G., Liu, H., Wei, Y., Wang, P., ... & Zhang, H. (2019). Optimization and characterization of pullulan production by a newly isolated high-yielding strain *Aureobasidium melanogenum*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 49(6), 557-566.
42. Chen, J., Liu, L., & Wei, D. (2017). Enhanced production of astaxanthin by *Chromochloris zofingiensis* in a microplate-based culture system under high light irradiation. *Bioresource Technology*, 245, 518–529. doi:10.1016/j.biortech.2017.08.10

43. Chen, S., Zheng, H., Gao, J., Song, H., & Bai, W. (2023). High-level production of pullulan and its biosynthesis regulation in *Aureobasidium pullulans* BL06. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 1131875.
44. Cimini, D., Argenzio, O., D'Ambrosio, S., Lama, L., Finore, I., Finamore, R., ... & Schiraldi, C. (2016). Production of succinic acid from *Basfia succiniciproducens* up to the pilot scale from *Arundo donax* hydrolysate. *Bioresource technology*, 222, 355-360.
45. Dai, J., Dong, A., Xiong, G., Liu, Y., Hossain, M. S., Liu, S., Gao, N., Li, S., Wang, J., & Qiu, D. (2020). Production of Highly Active Extracellular Amylase and Cellulase From *Bacillus subtilis* ZIM3 and a Recombinant Strain With a Potential Application in Tobacco Fermentation. *Frontiers in microbiology*, 11, 1539. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01539>
46. Davila M (2023). Exploring the world of flavor enhancers: understanding their uses and benefits in food. *AJFST*: 008.
47. Dessie, W., Xin, F., Zhang, W., Jiang, Y., Wu, H., Ma, J., & Jiang, M. (2018). Opportunities, challenges, and future perspectives of succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. *Applied microbiology and biotechnology*, 102, 9893-9910.
48. Dey, Subhashish & Nagababu, Bommu. (2022). Applications of Food Colour and Bio-Preservatives in the Food and Its Effect on the Human Health. *Food Chemistry Advances*. 1. 100019. [10.1016/j.focha.2022.100019](https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100019).
49. Elsayed, E. A., Farid, M. A., & El-Enshasy, H. A. (2019). Enhanced Natamycin production by *Streptomyces natalensis* in shake-flasks and stirred tank bioreactor under batch and fed-batch conditions. *BMC biotechnology*, 19(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0546-2>
50. El-Sayed, M. H., Arafat, H. H., Elsehemy, I. A., & Basha, M. (2016). Optimization, purification and physicochemical characterization of curdlan produced by *Paenibacillus* sp. strain NBR-10. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 13(2), 901-909.

51. Ercan, D., & Demirci, A. (2015). Effects of fed-batch and continuous fermentations on human lysozyme production by *Kluyveromyces lactis* K7 in biofilm reactors. *Bioprocess and biosystems engineering*, 38, 2461-2468.
52. Fahimitabar, A., Razavian, S. M. H., & Rezaei, S. A. (2021). Application of RSM for optimization of glutamic acid production by *Corynebacterium glutamicum* in bath culture. *Heliyon*, 7(6).
53. Fan, H., Chen, L., Sun, H., Wang, H., Ren, Y., & Wei, D. (2017). A novel nitrilase from *Ralstonia eutropha* H16 and its application to nicotinic acid production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40, 1271-1281.
54. Fernandes P. (2010). Enzymes in food processing: a condensed overview on strategies for better biocatalysts. *Enzyme research*, 2010, 862537. <https://doi.org/10.4061/2010/862537>
55. Ganguly, S., & Pattnaik, S. (2021). Empirical Optimization of Culture conditions for L-glutamic acid production by *Corynebacterium glutamicum* X680. *Int. J. Pharm. Sci. res.*, 12, 536-546.
56. Gao, H., Xie, F., Zhang, W., Tian, J., Zou, C., Jia, C., Jin, M., Huang, J., Chang, Z., Yang, X., & Jiang, D. (2020). Characterization and improvement of curdlan produced by a high-yield mutant of *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 based on whole-genome analysis. *Carbohydrate polymers*, 245, 116486. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116486>
57. García-García, Rebeca & Searle, S.S.. (2016). Preservatives: Food Use. *Encyclopedia of Food and Health*. 10.1016/B978-0-12-384947-2.00568-7.
58. Ghashghaei, T., Soudi, M. R., & Hoseinkhani, S. (2016). Optimization of xanthan gum production from grape juice concentrate using Plackett-Burman design and response surface methodology. *Applied Food Biotechnology*, 3(1), 15-23.

59. Guerrero-Urrutia, C., Volke-Sepulveda, T., Figueroa-Martinez, F., & Favela-Torres, E. (2021). Solid-state fermentation enhances inulinase and invertase production by *Aspergillus brasiliensis*. *Process Biochemistry*, 108, 169–175. doi:10.1016/j.procbio.2021.06.014
60. Gurtler, Joshua & Mai, T.L.. (2014). Traditional preservatives - organic acids. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 3. 119-130. 10.1016/B978-0-12-384730-0.00260-3.
61. Gutiérrez-Sánchez, G., Roussos, S., & Augur, C. (2013). Effect of caffeine concentration on biomass production, caffeine degradation, and morphology of *Aspergillus tamarii*. *Folia microbiologica*, 58(3), 195–200. <https://doi.org/10.1007/s12223-012-0197-3>.
62. Habibi, H., & Khosravi-Darani, K. (2017). Effective variables on production and structure of xanthan gum and its food applications: A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 10, 130-140.
63. Hamidi, M., Kennedy, J. F., Khodaiyan, F., Mousavi, Z., & Hosseini, S. S. (2019). Production optimization, characterization and gene expression of pullulan from a new strain of *Aureobasidium pullulans*. *International journal of biological macromolecules*, 138, 725-735.
64. Haq, I. U., Nawaz, A., Mukhtar, H., Mansoor, Z., Riaz, M., Ahmed, M., & Ameer, S. M. (2014). Random mutagenesis of *Aspergillus niger* and process optimization for enhanced production of glucose oxidase. *Pak. J. Bot*, 46(3), 1109-1114.
65. He, C., Zhang, Z., Zhang, Y., Wang, G., Wang, C., Wang, D., & Wei, G. (2021). Efficient pullulan production by *Aureobasidium pullulans* using cost-effective substrates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 186, 544-553.
66. He, N., Fang, C., Qiu, Z., & Bao, J. (2021). Increasing sodium lactate production by enhancement of Na⁺ transmembrane transportation in *Pediococcus acidilactici*. *Bioresource Technology*, 323, 124562. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124562>

67. Himashree, P., Sengar, A. S., & Sunil, C. K. (2022). Food thickening agents: Sources, chemistry, properties and applications-A review. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 27, 100468.
68. Hong, J., Park, S. H., Kim, S., Kim, S. W., & Hahn, J. S. (2019). Efficient production of lycopene in *Saccharomyces cerevisiae* by enzyme engineering and increasing membrane flexibility and NADPH production. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 211-223.
69. Hou, W., Zhang, M., & Bao, J. (2018). Cascade hydrolysis and fermentation of corn stover for production of high titer gluconic and xylonic acids. *Bioresource technology*, 264, 395-399.
70. Hrubša, M., Siatka, T., Nejmanová, I., Vopršalová, M., Kujovská Krčmová, L., Matoušová, K., Javorská, L., Macáková, K., Mercolini, L., Remião, F., Mátuš, M., Mladěnka, P., & On Behalf Of The Oeonom (2022). Biological Properties of Vitamins of the B-Complex, Part 1: Vitamins B1, B2, B3, and B5. *Nutrients*, 14(3), 484. <https://doi.org/10.3390/nu14030484>
71. Hrušková, M., & Novotna, D. (2003). Effect of ascorbic acid on the rheological properties of wheat fermented dough. *Czech Journal of Food Sciences*, 21(4), 137.
72. Ide, T., Hoya, M., Tanaka, T., & Harayama, S. (2012). Enhanced production of astaxanthin in *Paracoccus* sp. strain N-81106 by using random mutagenesis and genetic engineering. *Biochemical Engineering Journal*, 65, 37-43.
73. Jafari, Z., Najafpour Darzi, G., & Zare, H. (2023). Growth media optimization for production of alkaline protease from industrial wastewater using *Bacillus subtilis* PTCC 1254. *International Journal of Engineering*, 36(3), 513-522.
74. Jagtap, S. S., Bedekar, A. A., Singh, V., Jin, Y. S., & Rao, C. V. (2021). Metabolic engineering of the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* PO1f for production of erythritol from glycerol. *Biotechnology for biofuels*, 14(1), 188. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-02039-0>.

75. Jan, K. N., Tripathi, A. D., Singh, S., Surya, D., & Singh, S. P. (2017). Enhanced sorbitol production under submerged fermentation using *Lactobacillus plantarum*. *Journal Applied Food Biotechnology*, 4(2), 85.
76. Jiang, H., Xue, S. J., Li, Y. F., Liu, G. L., Chi, Z. M., Hu, Z., & Chi, Z. (2018). Efficient transformation of sucrose into high pullulan concentrations by *Aureobasidium melanogenum* TN1-2 isolated from a natural honey. *Food chemistry*, 257, 29-35.
77. Jidimma Augustine, Wapwera & Lori, Joseph & Achuen, Chukuka & Edah, Alexander. (2021). Acid In The Extraction And Isolation Of Ascorbic Acid (Vitamin C). *Analytical Chemistry*. 21. 172.
78. Jojima, T., Noburyu, R., Sasaki, M., Tajima, T., Suda, M., Yukawa, H., & Inui, M. (2015). Metabolic engineering for improved production of ethanol by *Corynebacterium glutamicum*. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(3), 1165–1172. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6223-4>.
79. Kang, P., Li, L., Yan, L., Ju, X., Hu, C., & Yao, X. (2019). Enhancement of erythritol production in *Trichosporonoides oedocephalis* by regulating cellular morphology with betaine. *Chemical Papers*, 73(8), 2065–2072. <https://doi.org/10.1007/s11696-019-00766-1>
80. Khadivi Derakshan, F., Darvishi, F., Dezfulian, M., & Madzak, C. (2017). Expression and characterization of glucose oxidase from *Aspergillus niger* in *Yarrowia lipolytica*. *Molecular biotechnology*, 59, 307-314.
81. Kildegaard, K. R., Adiego-Pérez, B., Belda, D. D., Khangura, J. K., Holkenbrink, C., & Borodina, I. (2017). Engineering of *Yarrowia lipolytica* for production of astaxanthin. *Synthetic and systems biotechnology*, 2(4), 287-294.
82. Klein, V. J., Brito, L. F., Perez-Garcia, F., Brautaset, T., & Irla, M. (2023). Metabolic engineering of thermophilic *Bacillus methanolicus* for riboflavin overproduction from methanol. *Microbial biotechnology*, 16(5), 1011–1026. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14239>

83. Kuivanen, J., Penttilä, M., & Richard, P. (2015). Metabolic engineering of the fungal D-galacturonate pathway for L-ascorbic acid production. *Microbial cell factories*, 14, 2. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0184-2>.
84. Lan, W., Zhang, R., Ji, T., Sameen, D. E., Ahmed, S., Qin, W., ... & Liu, Y. (2021). Improving nisin production by encapsulated *Lactococcus lactis* with starch/carboxymethyl cellulose edible films. *Carbohydrate Polymers*, 251, 117062.
85. Leandro, T., Oliveira, M. C., da Fonseca, M. M. R., & Cesário, M. T. (2023). Co-Production of Poly (3-hydroxybutyrate) and Gluconic Acid from Glucose by *Halomonas elongata*. *Bioengineering*, 10(6), 643.
86. Lei, M., Peng, X., Sun, W., Zhang, D., Wang, Z., Yang, Z., ... & Chen, Y. (2021). Nonsterile L-lysine fermentation using engineered phosphite-grown *Corynebacterium glutamicum*. *ACS omega*, 6(15), 10160-10167.
87. Li, L., Yang, T., Guo, W., Ju, X., Hu, C., Tang, B., Fu, J., Gu, J., & Zhang, H. (2016). Construction of an Efficient Mutant Strain of *Trichosporonoides oedocephalis* with HOG1 Gene Deletion for Production of Erythritol. *Journal of microbiology and biotechnology*, 26(4), 700–709. <https://doi.org/10.4014/jmb.1510.10049>
88. Li, P., Li, T., Zeng, Y., Li, X., Jiang, X., Wang, Y., ... & Zhang, Y. (2016). Biosynthesis of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* LREL1-1 using kitchen waste as the sole substrate. *Carbohydrate polymers*, 151, 684-691.
89. Linthorst, Arjan & Wal-Veuger, Johanna. (2014). Polarimetry and stereochemistry: The optical rotation of Vitamin C as a function of pH. *Educacion Quimica*. 25. 135-138. 10.1016/S0187-893X(14)70536-1.
90. Liu, C., Zhan, S., Tian, Z., Li, N., Li, T., Wu, D., Zeng, Z., & Zhuang, X. (2022). Food Additives Associated with Gut Microbiota Alterations in Inflammatory Bowel Disease: Friends or Enemies?. *Nutrients*, 14(15), 3049. <https://doi.org/10.3390/nu14153049>

91. Liu, X. J., Liu, R. S., Li, H. M., & Tang, Y. J. (2012). Lycopene production from synthetic medium by *Blakeslea trispora* NRRL 2895 (+) and 2896 (-) in a stirred-tank fermenter. *Bioprocess and biosystems engineering*, 35(5), 739–749. <https://doi.org/10.1007/s00449-011-0654-4>.
92. Lu, F., Ping, K., Wen, L., Zhao, W., Wang, Z., Chu, J., & Zhuang, Y. (2015). Enhancing gluconic acid production by controlling the morphology of *Aspergillus niger* in submerged fermentation. *Process biochemistry*, 50(9), 1342-1348.
93. Lu, F., Ping, K., Wen, L., Zhao, W., Wang, Z., Chu, J., & Zhuang, Y. (2015). Enhancing gluconic acid production by controlling the morphology of *Aspergillus niger* in submerged fermentation. *Process biochemistry*, 50(9), 1342-1348.
94. Lugani, Y., & Sook, B. S. (2020). Fermentative production of xylitol from a newly isolated xylose reductase producing *Pseudomonas putida* BSX-46. *Lwt*, 134, 109988.
95. Luo, Z., Liu, N., Lazar, Z., Chatzivasileiou, A., Ward, V., Chen, J., Zhou, J., & Stephanopoulos, G. (2020). Enhancing isoprenoid synthesis in *Yarrowia lipolytica* by expressing the isopentenol utilization pathway and modulating intracellular hydrophobicity. *Metabolic engineering*, 61, 344–351. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.07.010>.
96. M. Mwale, M. (2023). Health Risk of Food Additives: Recent Developments and Trends in the Food Sector. *IntechOpen*. doi: 10.5772/intechopen.109484
97. Ma, T., Shi, B., Ye, Z., Li, X., Liu, M., Chen, Y., Xia, J., Nielsen, J., Deng, Z., & Liu, T. (2019). Lipid engineering combined with systematic metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for high-yield production of lycopene. *Metabolic engineering*, 52, 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.11.009>.
98. Medina, A., Castillo, T., Flores, C., Núñez, C., Galindo, E., & Peña, C. (2023). Production of alginates with high viscosifying power and molecular weight by using the AT9 strain of *Azotobacter vinelandii* in batch cultures under different oxygen transfer conditions. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 98(2), 537-543.

99. Meena, M., Prajapati, P., Ravichandran, C., & Sehrawat, R. (2021). Natamycin: a natural preservative for food applications-a review. *Food science and biotechnology*, 30(12), 1481–1496. <https://doi.org/10.1007/s10068-021-00981-1>
100. Monika, Sheetal, Thakur, N., & Bhalla, T. C. (2022). An improved process for synthesis of nicotinic acid using hyper induced whole cell nitrilase of *Gordonia terrae* MTCC8139. *3 Biotech*, 12(11), 303.
101. Nahas, R.I. (2012). Natural antioxidants as food and beverage ingredients. 10.1533/9780857095725.1.100.
102. Naveed, M., Tianying, H., Wang, F., Yin, X., Chan, M. W. H., Ullah, A., ... & Khan, A. M. (2022). Isolation of lysozyme producing *Bacillus subtilis* Strains, identification of the new strain *Bacillus subtilis* BSN314 with the highest enzyme production capacity and optimization of culture conditions for maximum lysozyme production. *Current Research in Biotechnology*, 4, 290-301.
103. Nehad, E. A., & Atalla, S. M. (2020). Production and immobilization of invertase from *Penicillium* sp. using orange peel waste as substrate. *Egyptian Pharmaceutical Journal*, 19(2), 103-112.
104. Niknezhad, S. V., Asadollahi, M. A., Zamani, A., Biria, D., & Doostmohammadi, M. (2015). Optimization of xanthan gum production using cheese whey and response surface methodology. *Food Science and Biotechnology*, 24, 453-460.
105. Nishinari, K., Zhang, H., & Funami, T. (2021). Curdlan. In *Handbook of Hydrocolloids* (pp. 887–921). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-820104-6.00005-x>.
106. Omwene, P. I., Yağcıoğlu, M., Öcal-Sarihan, Z. B., Ertan, F., Keris-Sen, Ü. D., Karagunduz, A., & Keskinler, B. (2021). Batch fermentation of succinic acid from cheese whey by *Actinobacillus succinogenes* under variant medium composition. *3 Biotech*, 11, 1-10.

107. Oraei, M., Razavi, S. H., & Khodaiyan, F. (2018). Optimization of Effective Minerals on Riboflavin Production by *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* ATCC 6051 Using Statistical Designs. *Avicenna journal of medical biotechnology*, 10(1), 49–55.
108. Oyedeji, O., Bakare, M. K., Adewale, I. O., Olutiola, P. O., & Omoboye, O. O. (2017). Optimized production and characterization of thermostable invertase from *Aspergillus niger* IBK1, using pineapple peel as alternate substrate. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 9, 218–223. doi:10.1016/j.bcab.2017.01.001
109. Ozdal, M., & Kurbanoglu, E. B. (2019). Citric acid production by *Aspergillus niger* from agro-industrial by-products: Molasses and chicken feather peptone. *Waste and Biomass Valorization*, 10, 631–640.
110. Rahman, M. S., Al-Rizeiqi, M. H., Guizani, N., Al-Ruzaiqi, M. S., Al-Aamri, A. H., & Zainab, S. (2015). Stability of vitamin C in fresh and freeze-dried capsicum stored at different temperatures. *Journal of food science and technology*, 52(3), 1691–1697. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1173-x>.
111. Palladino, F., Rodrigues, R. C., Cadete, R. M., Barros, K. O., & Rosa, C. A. (2021). Novel potential yeast strains for the biotechnological production of xylitol from sugarcane bagasse. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 15(3), 690–702.
112. Pappu, S. M. J., & Gummadi, S. N. (2018). Effect of cosubstrate on xylitol production by *Debaryomyces nepalensis* NCYC 3413: A cybernetic modelling approach. *Process Biochemistry*, 69, 12–21.
113. Park, S. Y., Binkley, R. M., Kim, W. J., Lee, M. H., & Lee, S. Y. (2018). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for high-level astaxanthin production with high productivity. *Metabolic engineering*, 49, 105–115. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.08.002>.
114. Pérez-García, F., Klein, V. J., Brito, L. F., & Brautaset, T. (2022). From brown seaweed to a sustainable microbial feedstock for the production of riboflavin. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 863690.

115. Phan, A. D. T., Adiamo, O., Akter, S., Netzel, M. E., Cozzolino, D., & Sultanbawa, Y. (2021). Effects of drying methods and maltodextrin on vitamin C and quality of *Terminalia ferdinandiana* fruit powder, an emerging Australian functional food ingredient. *Journal of the science of food and agriculture*, 101(12), 5132–5141. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11159>.
116. Pothimon, R., Gullo, M., La China, S., Thompson, A. K., & Krusong, W. (2020). Conducting High acetic acid and temperature acetification processes by *Acetobacter pasteurianus* UMCC 2951. *Process Biochemistry*, 98, 41-50.
117. Rakicka-Pustułka, Magdalena & Mirończuk, Aleksandra & Celinska, Ewelina & Bialas, Wojciech & Rymowicz, Waldemar. (2020). Scale-up of the erythritol production technology – Process simulation and techno-economic analysis. *Journal of Cleaner Production*. 257. 120533. [10.1016/j.jclepro.2020.120533](https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120533).
118. Rosa, J. C. C., Colombo, L. T., Alvim, M. C. T., Avonce, N., Van Dijck, P., & Passos, F. M. L. (2013). Metabolic engineering of *Kluyveromyces lactis* for L-ascorbic acid (vitamin C) biosynthesis. *Microbial Cell Factories*, 12, 1-13.
119. Rosa, J. C., Colombo, L. T., Alvim, M. C., Avonce, N., Van Dijck, P., & Passos, F. M. (2013). Metabolic engineering of *Kluyveromyces lactis* for L-ascorbic acid (vitamin C) biosynthesis. *Microbial cell factories*, 12, 59. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-59>.
120. Ruchala, J., Andreieva, Y. A., Tsyurulnyk, A. O., Sobchuk, S. M., Najdecka, A., Wen, L., Kang, Y., Dmytruk, O. V., Dmytruk, K. V., Fedorovych, D. V., & Sibirny, A. A. (2022). Cheese whey supports high riboflavin synthesis by the engineered strains of the flavinogenic yeast *Candida famata*. *Microbial cell factories*, 21(1), 161. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01888-0>
121. Ruiz Rodríguez, L. G., Aller, K., Bru, E., De Vuyst, L., Hébert, E. M., & Mozzi, F. (2017). Enhanced mannitol biosynthesis by the fruit origin strain *Fructobacillus tropaeoli* CRL 2034. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(15), 6165–6177. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8395-1>

122. Saeed, S., Hashmi, A. S., Haq, I. U., Tayyab, M., Awan, A. R., Anjum, A. A., & Firyal, S. (2016). Bioconversion of agricultural by-products to alginate by *Azotobacter vinelandii* and physico-chemical optimization for Hyper-production. *THE JAPS*, 26, 1514-1519.
123. Saeed, S., Mehmood, T., & Irfan, M. (2023). Statistical optimization of cultural parameters for the optimized production of alginic acid using apple (*Malus domestica*) peels through solid-state fermentation. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 13(2), 1269-1277.
124. Saeed, S., Tayyab, M., Mehmood, T., Awan, A. R., Firyal, S., Nadeem, F., & Irfan, M. (2021). Valorization of potato peel for production of alginate and optimization of the process through response surface methodology (RSM) by using *Azotobacter nigricans*. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-9.
125. Sahi, S.S. (2014) *Ascorbic Acid and Redox Agents in Bakery Systems*. *Bakery Products Science and Technology*, 1, 183-197.
126. Salah, R. B., Chaari, K., Besbes, S., Blecker, C., & Attia, H. (2011). Production of xanthan gum from *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 by fermentation of date juice palm by-products (*Phoenix dactylifera* L.). *Journal of Food Process Engineering*, 34(2), 457-474.
127. Salman, T., Kamal, M., Ahmed, M., Siddiq, S. M., Khan, R. A., & Hassan, A. (2016). Medium optimization for the production of amylase by *Bacillus subtilis* RM16 in Shake-flask fermentation. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 29(2), 439–444.
128. Sharma, R., & Ghoshal, G. (2020). Optimization of carotenoids production by *Rhodotorula mucilaginosa* (MTCC-1403) using agro-industrial waste in bioreactor: A statistical approach. *Biotechnology Reports*, 25, e00407.
129. Siroli, L., Camprini, L., Pisano, M. B., Patrignani, F., & Lanciotti, R. (2019). Volatile molecule profiles and anti-*Listeria monocytogenes* activity of nisin producers *Lactococcus lactis* strains in vegetable drinks. *Frontiers in Microbiology*, 10, 563.

130. Sun, L., Xin, F., & Alper, H. S. (2021). Bio-synthesis of food additives and colorants-a growing trend in future food. *Biotechnology Advances*, 47, 107694. doi:10.1016/j.biotechadv.2020.10
131. Sunarno, J. N., Prasertsan, P., Duangsuwan, W., Cheirsilp, B., & Sangkharak, K. (2020). Improve biotransformation of crude glycerol to ethanol of *Enterobacter aerogenes* by two-stage redox potential fed-batch process under microaerobic environment. *Biomass and bioenergy*, 134, 105503.
132. Susa, Francesca and Pisano, Roberto (2023) *Advances in Ascorbic Acid (Vitamin C) Manufacturing: Green Extraction Techniques from Natural Sources. Processes*, 11 (11). 3167.
133. Talhi, I., Dehimat, L., Jaouani, A., Cherfia, R., Berkani, M., Almomani, F., Vasseghian, Y., & Chaouche, N. K. (2022). Optimization of thermostable proteases production under agro-wastes solid-state fermentation by a new thermophilic *Mycothermus thermophilus* isolated from a hydrothermal spring Hammam Debagh, Algeria. *Chemosphere*, 286(Pt 1), 131479. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131479>
134. Thuy, N. T. H., Kongkaew, A., Flood, A., & Boontawan, A. (2017). Fermentation and crystallization of succinic acid from *Actinobacillus succinogenes* ATCC55618 using fresh cassava root as the main substrate. *Bioresource technology*, 233, 342-352.
135. Tomaszewska-Hetman, L., Rymowicz, W., & Rywińska, A. (2020). Waste conversion into a sweetener—development of an innovative strategy for erythritol production by *Yarrowia lipolytica*. *Sustainability*, 12(17), 7122.
136. Tramontin, L. R. R., Kildegaard, K. R., Sudarsan, S., & Borodina, I. (2019). Enhancement of Astaxanthin Biosynthesis in Oleaginous Yeast *Yarrowia lipolytica* via Microalgal Pathway. *Microorganisms*, 7(10), 472. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100472>.

137. Tsykhanovska, Iryna & Evlash, Victoriya & Blahyi, Olga. (2020). Mechanism of water-binding and water-retention of food additives nanoparticles based on double oxide of two- and trivalent iron. *Ukrainian Food Journal*. 9. 298-321. [10.24263/2304-974X-2020-9-2-4](https://doi.org/10.24263/2304-974X-2020-9-2-4).
138. Varvara, M., Bozzo, G., Celano, G., Disanto, C., Pagliarone, C. N., & Celano, G. V. (2016). The Use of Ascorbic Acid as a Food Additive: Technical-Legal Issues. *Italian journal of food safety*, 5(1), 4313. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2016.4313>.
139. Wang, Q. Q., Lin, J., Zhou, Q. Z., Peng, J., Zhang, Q., & Wang, J. H. (2024). Hyper-Production of Pullulan by a Novel Fungus of *Aureobasidium melanogenum* ZH27 through Batch Fermentation. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(1), 319.
140. Wang, Y. H., Zhang, R. R., Yin, Y., Tan, G. F., Wang, G. L., Liu, H., Zhuang, J., Zhang, J., Zhuang, F. Y., & Xiong, A. S. (2023). Advances in engineering the production of the natural red pigment lycopene: A systematic review from a biotechnology perspective. *Journal of advanced research*, 46, 31–47. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2022.06.010>
141. Wu, L., Zhang, C., Long, Y., Chen, Q., Zhang, W., & Liu, G. (2021). Food additives: From functions to analytical methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–21.
142. Wu, X., Yao, H., Liu, Q., Zheng, Z., Cao, L., Mu, D., ... & Li, X. (2018). Producing acetic acid of *Acetobacter pasteurianus* by fermentation characteristics and metabolic flux analysis. *Applied biochemistry and biotechnology*, 186, 217-232.
143. Xu, F., Liu, C., Xia, M., Li, S., Tu, R., Wang, S., Jin, H., & Zhang, D. (2023). Characterization of a Riboflavin-Producing Mutant of *Bacillus subtilis* Isolated by Droplet-Based Microfluidics Screening. *Microorganisms*, 11(4), 1070. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11041070>

144. Xu, J. Z., Ruan, H. Z., Yu, H. B., Liu, L. M., & Zhang, W. (2020). Metabolic engineering of carbohydrate metabolism systems in *Corynebacterium glutamicum* for improving the efficiency of L-lysine production from mixed sugar. *Microbial cell factories*, 19(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-1294-7>
145. Xu, J. Z., Wu, Z. H., Wu, S. J., & Zhang, W. (2018). Rational modification of tricarboxylic acid cycle for improving L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbial cell factories*, 17(1), 105. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0958-z>
146. Xu, J.-Z., Yu, H.-B., Han, M., Liu, L.-M., & Zhang, W.-G. (2019). Metabolic engineering of glucose uptake systems in *Corynebacterium glutamicum* for improving the efficiency of l-lysine production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. doi:10.1007/s10295-019-02170-w
147. Xu, K., & Xu, P. (2014). Efficient calcium lactate production by fermentation coupled with crystallization-based in situ product removal. *Bioresource technology*, 163, 33-39. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.002>
148. Xue, S. J., Chen, L., Jiang, H., Liu, G. L., Chi, Z. M., Hu, Z., & Chi, Z. (2019). High pullulan biosynthesis from high concentration of glucose by a hyperosmotic resistant, yeast-like fungal strain isolated from a natural comb-honey. *Food chemistry*, 286, 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.206>
149. Yang, M., Zhu, Y., Li, Y., Bao, J., Fan, X., Qu, Y., ... & Li, Q. (2016). Production and optimization of curdlan produced by *Pseudomonas* sp. QL212. *International journal of biological macromolecules*, 89, 25-34.
150. Yang, Q., Wu, M., Dai, Z., Xin, F., Zhou, J., Dong, W., ... & Zhang, W. (2020). Comprehensive investigation of succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*: a promising native succinic acid producer. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 14(5), 950-964
151. Yuwa-amornpitak, T., & Chookietwatana, K. (2016). Development of ethanol production from cooking oil glycerol waste by mutant *Enterobacter aerogenes*. *African Journal of Biotechnology*, 15(41), 2344-2351.

152. Zare, H., Meiguni, F., & D Najafpour, G. (2021). Production of alkaline protease using industrial waste effluent as low-cost fermentation substrate. *Iranica Journal of Energy & Environment*, 12(3), 264-272.
153. Zeng, X., Miao, W., Zeng, H., Zhao, K., Zhou, Y., Zhang, J., Zhao, Q., Tursun, D., Xu, D., & Li, F. (2019). Production of natamycin by *Streptomyces gilvosporeus* Z28 through solid-state fermentation using agro-industrial residues. *Bioresource technology*, 273, 377–385. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.009>
154. Zhang, C., Qin, J., Dai, Y., Mu, W., & Zhang, T. (2019). Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) mutagenesis enables xylitol over-production with yeast *Candida tropicalis*. *Journal of biotechnology*, 296, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.01.026>
155. Zhang, H., Zhang, J., & Bao, J. (2016). High titer gluconic acid fermentation by *Aspergillus niger* from dry dilute acid pretreated corn stover without detoxification. *Bioresource technology*, 203, 211-219.
156. Zhang, L., Nie, M.-Y., Liu, F., Chen, J., Wei, L.-J., & Hua, Q. (2021). Multiple gene integration to promote erythritol production on glycerol in *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters*, 43(7), 1277–1287. doi:10.1007/s10529-021-03113-1
157. Zhang, M., Gu, L., Cheng, C., Ma, J., Xin, F., Liu, J., Wu, H., & Jiang, M. (2018). Recent advances in microbial production of mannitol: utilization of low-cost substrates, strain development and regulation strategies. *World journal of microbiology & biotechnology*, 34(3), 41. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2425-8>
158. Zhao, J., Liu, Y., & Ma, M. (2020). Production of calcium lactate from eggshell fermentation by *Enterococcus mundtii* cells immobilized on different carriers. *Shipin Kexue/Food Science*, 41(2), 80-86. 10.7506/spkx1002-6630-20190630-421
159. Zong, G., Cao, G., Fu, J., Zhang, P., Chen, X., Yan, W., ... & Zhang, R. (2023). Novel mechanism of hydrogen peroxide for promoting efficient natamycin synthesis in *Streptomyces*. *Microbiology Spectrum*, e00879-23