

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
факультет фармацевтичних технологій та менеджменту
кафедра біотехнології**

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**на тему: «АНАЛІЗ ТЕХНОЛОГІЙ ОТРИМАННЯ β -КАРОТИНУ
БІОТЕХНОЛОГІЧНИМИ МЕТОДАМИ»**

Виконав: здобувач вищої освіти групи ПБтм23(1,6д)-01
спеціальності: 162 Біотехнології та біоінженерія
освітньої програми Промислова біотехнологія
Олександра МАНЖОС

Керівник: професорка закладу вищої освіти кафедри біо-
технології, д. б. н., професор Ольга ФІЛІПЦОВА

Рецензент: Завідувачка кафедри промислової технології
ліків та косметичних засобів, д. фарм. н, професорка
Олена РУБАН

Харків – 2025 рік

АНОТАЦІЯ

У роботі проведено аналіз даних наукової літератури щодо характеристики і класифікації основних каротиноїдів. Проведено аналіз літературних джерел щодо класифікації та різноманітності мікроорганізмів-продуцентів каротиноїдів, зокрема бета-каротину. Розглянуто інші методи отримання бета-каротину – екстракція та хімічний синтез. Описано дві найбільш розповсюджені технології отримання бета-каротину.

Робота складається зі вступу, трьох розділів, висновку. Загальний обсяг роботи 48 сторінок, кількість таблиць 7, рисунків 19, джерел літератури 31.

Ключові слова: каротиноїди, бета-каротин, біосинтез.

ANNOTATION

The paper analyzes the scientific literature data on the characterization and classification of the main carotenoids. The analysis of literary sources on the classification and diversity of microorganisms producing carotenoids, in particular beta-carotene, was carried out. Other methods of obtaining beta-carotene, such as extraction and chemical synthesis, are considered. The two most common technologies for the production of beta-carotene are described.

The paper consists of an introduction, three chapters, and a conclusion. The total volume of the work is 48 pages, the number of tables is 7, figures is 19, references are 31.

Key words: carotenoids, beta-carotene, biosynthesis.

ЗМІСТ

ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	7
1.1. Каротиноїди: огляд і характеристика.....	7
1.2. Бета-каротин: характеристика, застосування у різних галузях.....	10
1.3. Методи отримання бета-каротину.....	14
Висновки до розділу 1.....	19
РОЗДІЛ 2. ОБ’ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	20
2.1 Характеристика мікроводоростей-продуцентів бета-каротину	20
2.2 Характеристика грибів-продуцентів бета-каротину.	26
2.3. Характеристика бактерій-продуцентів бета-каротину.....	33
Висновки до розділу 2.....	36
РОЗДІЛ 3. ДОСЛІДЖЕННЯ ЩОДО ПРОМИСЛОВОГО	
ОТРИМАННЯ БЕТА-КАРОТИНУ	37
3.1 Технологічний процес отримання бета-каротину з гриба <i>Blakeslea</i> <i>trispora</i>	37
3.2 Технологічний процес біосинтезу бета-каротину з мікроорганізму <i>Dunaliella salina</i>	40
Висновки до розділу 3.....	43
ВИСНОВКИ	44
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	45
ДОДАТКИ	49

ВСТУП

Актуальність теми. На сьогоднішній день бета-каротин є одним із найважливіших природних пігментів, який широко використовується в харчовій, фармацевтичній, ветеринарній, косметичній та інших галузях. Попит на цей продукт зростає через те, що він має корисні властивості – антиоксидант, який окрім цього бере участь у багатьох процесах в організмі. Проте традиційні методи отримання бета-каротину стають все менш ефективними у порівнянні з біотехнологічними.

Біотехнологічний метод виробництва бета-каротину має низку переваг, таких як: нижча собівартість у співвідношенні до кількості готового продукту, незалежність від сезону та місцевості. Він пропонує вирішення цих проблем завдяки використанню мікроорганізмів, вибір яких можна допасувати до потреб споживача, так само як і технологію виробництва. Крім того, мікробіологічний метод дозволяє контролювати умови культивування, оптимізуючи процес для підвищення продуктивності, бо багато факторів впливають на біосинтез каротиноїдів.

Сучасні наукові дослідження активно працюють над удосконаленням біотехнологічних підкодів, які спрямовані на зниження витрат на виробництво та підвищення виходу готового продукту. Важливим є оптимізація живильного середовища, температури, освітлення та інших умов. Також це дозволить стабілізувати характеристики продукту у промислових масштабах.

Розвиток біотехнологічного виробництва бета-каротину сприяє зменшенню залежності від традиційних джерел і сприяє сучасним екологічним вимогам екосистеми. Завдяки екологічній безпеці, економічній вигідності, а також широким можливостям адаптації, цей метод стає все більш затребуваним у різних галузях. Біотехнологічний підхід відкриває нові перспективи для сталого розвитку та інновацій у виробництві натуральних продуктів.

Мета дослідження – провести аналіз літератури щодо сучасного стану виробництва бета-каротину біотехнологічними методами.

Завдання дослідження:

- систематизувати дані наукових джерел щодо хімічної будови, властивостей та методів отримання каротиноїдів;
- узагальнити дані щодо характеристик бета-каротину, його застосування у різних галузях та методів отримання;
- проаналізувати дані наукової літератури щодо продуцентів бета-каротину та умов їх культивування;
- Провести порівняльний аналіз технологічних процесів отримання бета-каротину мікробним синтезом.

Предмет дослідження є біотехнологічні процеси, пов'язані з отриманням бета-каротину.

Об'єкт дослідження – є мікроорганізми-продуценти, що використовуються для виробництва бета-каротину. Вивчення умов їх культивування, складу поживного середовища, та впливу технологічних факторів на ефективність процесу.

Методи наукових досліджень. описового дослідження - проаналізовані літературні і доступні в Інтернеті джерела; графічні методи - складені схеми, таблиці; технологічні методи - проведено аналіз технологічних процесів отримання бета-каротину мікробним синтезом.

Практичне значення отриманих результатів. На підставі проведеного аналізу сформульовано підходи щодо складу поживних середовищ, умов культивування мікроорганізмів-продуцентів бета-каротину, що дозволить підвищити ефективність процесу отримання бета-каротину на підприємствах.

Апробація результатів дослідження і публікації.

Манжос О.І., Хохленкова Н. В. Сучасні методи отримання бета-каротину: Youth Pharmacy Science: матеріали V Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю (10-11 грудня 2024 р., м. Харків). – Харків: НФаУ, 2024. – 532 с.

Структура та обсяг кваліфікаційної роботи

Робота складається зі вступу, трьох розділів: літературний огляд,

об'єкти та методи досліджень, дослідження щодо промислового отримання бета-каротину, висновку. Загальний обсяг роботи 48 сторінок, кількість таблиць 7, рисунків 19, джерел літератури 31.

РОЗДІЛ І

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Каротиноїди: огляд і характеристика

Речовина, яку зараз називають «каротин», вперше була отримана вченим Вакенродером у 1831 році – він отримав рубіново-червоні кристали з моркви (*Daucus carota*). Але, тільки в 1907 році молекулярна формула каротину $C_{40}H_{56}$ була визначена вченим Вільштейдером, хоча це і була суміш альфа- та бета-каротину. В 1930 році вчені Каррер і Кун виділили молекулярну формулу лікопіну (рис.1.1), бета-каротину (рис.1.2), альфа-каротину (рис.1.3), зеаксантину (рис.1.4), а також лютеїну (рис.1.5)[29].

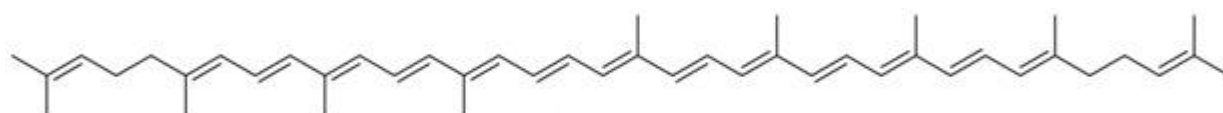


Рис. 1.1. Лікопін

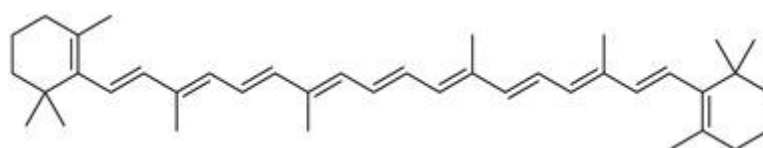


Рис. 1.2 Бета-каротин

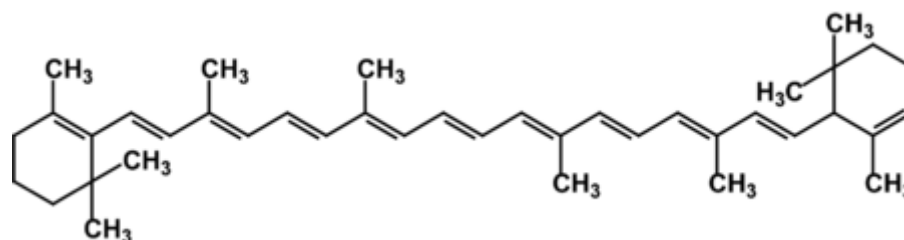


Рис.1.3 Альфа-каротин

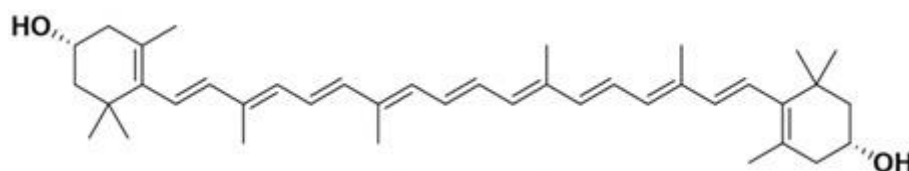


Рис. 1.4 Зеаксантин

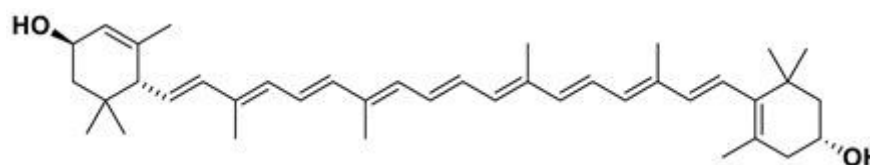


Рис. 1.5 Лютеїн

Каротиноїди – це пігменти, що надають червоне, жовте та помаранчеве

забарвлення, містяться у фруктах, квітах, коренях, водоростях, деяких безхребетних, рибах, птахів, бактеріях, грибах та дріжджах. Ці молекули беруть участь у процесах фотосинтезу, а також забезпечують фотозахист. Тим не менш, каротиноїди відомі як попередники вітаміну А (провітамін А), і це їх основна функція. Вітамін А є першорядним зоровим пігментом. Гіповітаміноз цього вітаміну у людей є серйозною проблемою, що призводить до проблем з зором, виробленням слюзи або взагалі до сліпоты[2].

Вітамін А також виконує важливі функції росту та репродуктивної ефективності, а також підтримки епітеліальних тканин та запобігання їх ороговіння. Також ретиноїди широко використовуються в дерматології та косметології, наприклад, для лікування акне та усунення зморшок[1].

Будь-який каротиноїд з циклічною структурою, що містить бета-кільце, має активність провітаміну А. Основним каротиноїдом з такою характеристикою є бета-каротин, який, за допомогою ферменту бета-каротин-15,15'-діоксигенази, перетворюється в ретиналь. Антиоксидантні властивості каротиноїдів пов'язані зі здатністю зв'язуватися з киснем а допомогою подвійних зв'язків, причому чим більше таких зв'язків – тим більша ефективність захисту. Таким чином, найбільш ефективними антиоксидантами будуть каротиноїди з більш ніж дев'ятьма такими зв'язками. Наприклад, лікопін демонструє більші антиоксидантні властивості, ніж бета-каротин. Завдяки цим антиоксидантним властивостям бета-каротин використовується як пероральний сонцезахисний засіб, що запобігає фотостарінню шкіри та сонячним опікам. Щоб отримати такий ефект, його треба вживати протягом кількох тижнів, щоб підвищити його вміст в організмі та покращити захисний ефект [7].

За останні десятиліття промислове виробництво харчових барвників активно розширюється. Проте сучасні тенденції, пов'язані з пошуком натуральних компонентів, викликані турботою про здоров'я споживачів, стимулюють міжнародний ринок пігментів до впровадження природних барвників замість синтетичних або штучних. У 2019 році світовий ринок каротиноїдів оцінювався в 1,5 мільярда доларів, а до 2026 року прогнозується його зростання до 2

мільярдів доларів. Це вказує на значний потенціал для бізнесу в цій галузі[8]. Деякі компанії, що виробляють каротиноїди наведено нижче (табл. 1.1).

Таблиця 1.1

Компанії, що виробляють каротиноїди

Компанія	Продукт	Країна-виробник	Вебсторінка
Alga Technologies	Олеорезин, капсули, порошок та емульсія астаксантину	Ізраїль	algatech.com
BASF	Суміш каротиноїдів	Австралія	worldaccount.basf.com
BlueBiotech	Порошок з мікробіодоростей з астаксантином	Німеччина	bluebiotech.de.com
Fuji Chemical Industries	Астаксантин в капсулах, таблетках, порошок та біомаса мікробіодоростей	США та Швеція	astareal.com
Plankton Australia Pty Limited	Суміш мікробіодоростей з астаксантином	Австралія	planktonaustralia.com
Nature Beta Technologies (NBT) Ltd.	Бета-каротин та 9-цис-бета-каротин	Ізраїль	nikken-miho.com
Parry Nutraceuticals	Астаксантин, суміш бета-каротину, зеаксантин, криптоксантин, лютеїн	Індія	parrynutraceuticals.com

Виробництво натуральних пігментів у промислових масштабах та підвищення вартості продукції є важливими аспектами, що сприяють активним дослідженням у біотехнологічному виробництві каротиноїдів. Ці барвники можуть бути отримані за допомогою промислової ферментації, яка включає

дві основні фази: фазу росту, спрямовану на збільшення мікробної біомаси, та фазу синтезу, під час якої об'єм біомаси залишається стабільним, але інтенсивність вироблення каротиноїдів зростає. Спрямованість на природні пігменти мотивує багато країн інвестувати у розвиток біотехнологій для отримання каротиноїдів природного походження[10].

1.2. Бета-каротин: характеристика, застосування у різних галузях

Бета-каротин – це основне джерело провітаміну А, а також широко використовуваний харчовий барвник. У природі відомо 1167 видів каротиноїдів, з яких 38–50 мають властивості провітаміну А, серед них бета-каротин, бета-криптоксантин, альфа-каротин тощо. Найбільш поширеним харчовим провітаміном А є бета-каротин, який має унікальну структуру, що включає вісім ізопренових одиниць і два бета-іононових кільця на кінцях молекули. Ця сполука відповідає за забарвлення грибів, фруктів і овочів завдяки своїй здатності поглинати світло[9].

Спожитий бета-каротин переважно засвоюється в дванадцятипалій кишці тонкого кишечника. Його здатність перетворюватися на ретинол зробила метаболізм цієї сполуки об'єктом ретельних досліджень. Розщеплення бета-каротину може бути симетричним або асиметричним, що призводить до утворення ретиналю (ретинальдегіду), який згодом відновлюється до ретинолу. Основне розщеплення бета-каротину відбувається в ентероцитах та гепатоцитах. У присутності кисню фермент бета-каротин-15,15'-оксигеназа симетрично окислює подвійний зв'язок 15,15' у бета-каротині, генеруючи дві молекули ретиналю[3].

Асиметричне розщеплення подвійного зв'язку 9,10' у бета-каротині каталізується бета-каротин-9',10'-оксигеназою 2 (BCO2), що призводить до утворення бета-апо-10'-каротиналю. Інші типи асиметричного розщеплення можуть також відбуватися за участю ферментів або без них, формуючи бета-апо-8'-каротин або бета-апо-14'-каротин. Проте ферменти, відповідальні за ці реакції, залишаються неідентифікованими.

Нові дослідження продемонстрували, що продукти асиметричного розщеплення можуть піддаватися подальшому розщепленню бета-каротин-15,15'-оксигеназою з утворенням ретиналю. Експерименти на мишах із нокаутом генів BCO1, BCO2 та BCO1/BCO2 показали, що відсутність BCO1 порушує гомеостаз бета-каротину, тоді як утворення бета-апо-10'-каротину залежить від активності BCO2. Крім того, бета-апо-10'-каротинол може етерифікуватися й транспортуватися у формі ретинолу.

Застосування в харчовій промисловості

Бета-каротин використовується як харчовий барвник у різних концентраціях, що дозволяє отримувати продукти з відтінками від помаранчевого до жовтого. Наприклад, соки, газовані напої, кондитерські вироби та молочні продукти часто збагачують бета-каротином для створення привабливого вигляду. Він також виконує роль харчової добавки як джерела провітаміну А. Ця сполука особливо важлива в регіонах із недостатнім споживанням вітаміну А, де її додавання до основних продуктів харчування може запобігти розвитку авітамінозу та пов'язаних з ним захворювань, таких як нічна сліпота[21].

Для того щоб бета-каротин ефективно перетворювався на вітамін А, його необхідно розчинити у водному середовищі (наприклад, у соках та напоях) або у жировій основі (масло, маргарин, сир). Кристали бета-каротину при цьому повинні бути подрібнені для кращого засвоєння організмом. Застосування нанотехнологій для створення мікрокапсул із бета-каротином є ще одним сучасним підходом, що підвищує біодоступність цієї сполуки.

Іншим перспективним підходом до підвищення вмісту бета-каротину в їжі є використання морквяного соку або застосування генетичних модифікацій. Генна інженерія дозволяє підвищити рівень біосинтезу каротиноїдів у рослинах. Яскравим прикладом є "золотий рис", збагачений бета-каротином, а також генетично модифіковані сорти картоплі, помідорів, батату та кукурудзи. Такі модифікації забезпечують значний внесок у боротьбу з глобальною проблемою дефіциту вітаміну А [24].

Застосування у фармацевтиці і медицині.

Через те що бета-каротин є основним джерелом провітаміну А, який потрібен для підтримки багатьох процесів в організмі, його додають до вітамінів. Також він застосовується для лікування авітамінозу а також станів, пов'язаних з нестачею вітаміну А. Також його призначають пацієнтам, які мають проблеми з засвоєнням жирів, що впливає на рівень вітаміну А в організмі [11]. Ще однією важливою функцією бета-каротину є застосування у відновлювальних терапіях, наприклад, після операцій, коли особливо важливо підтримувати достатній рівень вітамінів в організмі.

Застосування в косметології

Бета-каротин, як згадувалося раніше, входить до складу багатьох косметичних засобів завдяки своїм антиоксидантним властивостям. Він зв'язується з вільними радикалами, тим самим уповільнюючи процеси старіння шкіри. Також він стимулює вироблення колагену, відновлює клітини шкіри, покращує її пружність і надає здоровий колір. Ще його додають до сонцезахисних кремів і сироваток, завдяки чому підвищуються сонцезахисні властивості [15]. Окрім засобів для шкіри, бета каротин також додають до засобів для волосся – шампунів, масок і кондиціонерів. Він зміцнює волосяний фолікул, сприяє зменшенню випадіння волосся та відновлює його структуру. Інноваційні розробки в косметичній промисловості спрямовані на підвищення ефективності використання бета-каротину через створення нанокапсул або ліпосом, які покращують проникнення активних компонентів у глибокі шари шкіри чи структуру волосся [14].

Застосування у ветеринарії

Бета-каротин використовується у якості добавок до кормових сумішей для птахів, особливо для курей. При додаванні його до складу кормів для курей покращується колір жовтків яєць, з білого на золотисто-жовтий, що є важливим для продажу. Окрім цього, у самок поліпшуються репродуктивні функції, підвищується імунітет, а молоді особини краще ростуть і розвиваються [19].

Також бета-каротин використовують у годівлі лососевих риб, тому що він надає м'ясу насичений відтінок за рахунок накопичення пігменту у тканинах. Окрім цього покращується загальний стан здоров'я риб, підвищується опір захворюванням і стресам. Застосування бета-каротину в кормовій промисловості є економічно вигідним та екологічно обґрунтованим рішенням. Розширення досліджень впливу бета-каротину на здоров'я тварин і якість кінцевої продукції допоможе вдосконалити технології його застосування, забезпечуючи підвищення конкурентоспроможності фермерських господарств та аквакультур.

Застосування в харчовій біотехнології

Бета-каротин займає важливу роль у ферментації та слугує важливим біологічним пігментом, проміжною сировиною для створення певних продуктів. Його додають до ферментерів, в середині яких він може бути джерелом антиоксидантів, прекурсором для синтезу вітаміну А, а також регулятором метаболізму. У ферментації бета-каротин застосовується для створення напоїв із додатковими поживними властивостями, зокрема пробіотичних йогуртів та напоїв із підвищеним вмістом вітамінів. Він також використовується у процесах культивування мікроводоростей, що є джерелом омега-3 жирних кислот і білків [16].

Застосування бета-каротину в харчовій біотехнології відкриває нові горизонти для інтеграції натуральних компонентів у виробничі процеси. У ферментації він не лише слугує біологічно активним пігментом, а й оптимізує процеси синтезу цінних сполук, що робить виробництво більш економічно ефективним і екологічно стійким. Окрім цього, бета-каротин використовують у процесі виготовлення біопластиків – через яскравий колір та екологічність ця речовина є ідеальним пігментом, який надає упаковці привабливого кольору і водночас є безпечним для контакту з продуктами харчування. Розширення застосування таких матеріалів у харчовій промисловості може зменшити залежність від синтетичних барвників і пластику, забезпечуючи екологічний підхід до упаковки продуктів [13].

1.3. Методи отримання бета-каротину

Екстракція з рослинної сировини

Найдавніший метод отримання каротиноїдів – це екстракція з рослинної сировини, яка відбувається за допомогою фізико-хімічних процесів. Каротиноїди виділяють з зелених частин рослин, квітів, фруктів. Насіння, коренів та бульб. Вони містяться в овочах, таких як морква, гарбуз, шпинат, помідори, та фруктах – кавунах та малині. В рослинних клітинах каротиноїди знаходяться в мембранах тилакоїдів – органелах хлоропластів. Нижче наведено наявність бета-каротину в деяких овочах та фруктах (табл. 1.2).

Таблиця 1.2

Наявність бета-каротину в деяких фруктах і овочах

Сировина	Каротиноїди, мг/100г
Морква	9.938
Томати	0.64
Шпинат	4.243
Капуста	5.35
Петрушка	5.41
Броколі	0.92
Сквош	2.974
Червоний солодкий перець	3.165
Полуниця	0.014
Малина	0.016
Лохина	0.034
Апельсин	0.114
Червоний кавун	0.23

Найпопулярнішим джерелом бета-каротину є морква. Процедура отримання речовини складається з наступних етапів: очищення та подрібнення сировини, віджимання соку, коагуляція білків, відстоювання, центрифугування,

екстракція органічним розчинником, фільтрація, дезодорація, випарювання, кристалізація. У окремих випадках сировину піддають ферментації, сушінню або повторній фрагментації для підвищення ефективності екстракції каротиноїдів[17].

Основним недоліком отримання каротиноїдів з рослинної сировини є висока вартість, географічна прив'язка та сезонність сировини. Для отримання кількох грамів каротиноїдів треба переробити кілька десятків кілограмів рослинної сировини. Наприклад, 100 кг моркви дасть лише 4 г альфа- і бета-каротину в кристалічній формі. Тому для підвищення ефективності використовуються різні генетичні модифікації, які збільшують вміст каротиноїдів в рослинах[18].

Натуральні каротиноїди дуже не стійкі до зовнішніх чинників, таких як температура чи вологість, а також змінний склад барвників та допоміжних речовин. Також не легко отримати різні кольори або стабілізувати відтінки. Також великим недоліком є специфічний запах і смак отримуваний з рослинної сировини каротиноїдів, а ці критерії є одними з ключових критеріїв оцінки з боку споживачів[31].

Хімічний синтез

Хімічний синтез відіграє ключову роль у створенні каротиноїдів із моменту його розробки в 1950-х роках завдяки зусиллям Каррера, Югстера, Інхоффена і Міласа. Вже через кілька років після відкриття, бета, бета-каротин почали виготовляти у промислових масштабах, використовуючи його як барвник у харчовій промисловості та кормовій індустрії. Важливо зазначити, що з поміж майже 700 відомих природних каротиноїдів лише невелика частка підлягає промислому синтезу. До таких речовин належать лікопін, кантаксантин, астаксантин, бета, бета-каротин, бета-апо-8'-каротин та цитранаксантин[30].

Реакції Віттіга, які забезпечують синтез альдегідів і кетонів із застосуванням трифенілфосфінових похідних, сьогодні знаходять широке застосування у фармацевтичній та агрохімічній промисловості. Наприклад, ця реакція

використовується для синтезу природних і напівсинтетичних лікарських засобів, таких як ретиноїди, що мають структури, подібні до каротиноїдів.



Механізм реакції включає утворення ілідів, які реагують із карбонільними сполуками, утворюючи кінцеві продукти. Для отримання каротиноїдів, таких як β,β -каротин, використовують комбінацію двох молекул фосфонієвої солі (C15) із молекулою діальдегіду (C10). У результаті отримують симетричну 40-вуглецеву структуру. Цей процес супроводжується ізомеризацією, яка стабілізує продукт і дозволяє отримати бажаний ізомер.

Металоорганічні сполуки Гріньяра також мають вагоме значення в сучасній хімії. Наприклад, вони використовуються для отримання вітамінів та антиоксидантів, де каротиноїди виступають як базові компоненти. У цьому процесі реакція відбувається між дикетонами та органомангнієвими сполуками. Це дозволяє синтезувати стабільні структури з високою вихідною ефективністю.

Однак обмеження методу полягають у його чутливості до вологи та кисню, що вимагає використання інертного середовища. Крім того, складність очищення продуктів може ускладнювати масштабування цього методу для промислового застосування.

Реакції Віттіга демонструють вищу гнучкість у створенні різних структур каротиноїдів, тоді як метод Гріньяра забезпечує кращий контроль над стереохімією продуктів. З точки зору економічної ефективності, метод Віттіга є більш доступним для промислових масштабів завдяки використанню менш чутливих реагентів. Однак у випадках, коли потрібна висока специфічність і чистота продукту, метод Гріньяра залишається пріоритетним[20].

Попри успіхи в хімічному синтезі, підвищена увага до біобезпеки синтетичних продуктів спонукає до дослідження мікробіологічних методів отримання каротиноїдів. Мікроорганізми, такі як *Rhodotorula*, *Dunaliella* та *Blakeslea*, здатні виробляти β -каротин природним шляхом, що знижує ризики,

пов'язані з токсичністю. У майбутньому можливе поєднання хімічного та біологічного підходів для створення нових екологічно безпечних методів виробництва каротиноїдів[27].

Мікробіологічний синтез

Мікробіологічне виробництво бета-каротину є важливою альтернативою традиційним хімічним методам через його екологічну безпеку і економічні переваги. Одним з основних біологічних джерел цього каротиноїду є водорості роду *Dunaliella*, які здатні синтезувати значні обсяги бета-каротину. Додатково, інші види водоростей, а також певні бактерії, наприклад *Rhodococcus maris* та *Rhodobacter sphaeroides*, також виявляють потенціал для продукування цього важливого пігменту.

Дріжджі *Yarrowia lipolytica* також привертають увагу науковців завдяки їх здатності до швидкого росту та використанню різних вуглецевих джерел, включаючи побічні продукти інших виробництв. Це робить ці мікроорганізми цікавими для біотехнологічного виробництва бета-каротину, оскільки вони можуть ефективно використовувати дешеві та доступні ресурси.

Невід'ємним етапом процесу виробництва є екстракція бета-каротину з біомаси після завершення синтезу. Для досягнення максимальної чистоти продукту необхідно застосовувати методи, які ефективно руйнують клітинні мембрани і дозволяють вивільнити бета-каротин. Застосування механічних, хімічних або ферментативних методів екстракції дозволяє зменшити втрати та покращити ефективність процесу.

Ще одним важливим аспектом є використання гліцерину, побічного продукту біодизельного виробництва, як доступного джерела вуглецю для біотехнологічних процесів. Збільшення обсягів гліцерину, що доступний завдяки зростанню виробництва біодизеля, робить його економічно вигідним для застосування в синтезі бета-каротину, що підвищує ефективність технологій та відповідає вимогам сталого розвитку.

Попри численні переваги мікробіологічного синтезу, існують певні ви-

клики, пов'язані з оптимізацією умов культивування мікроорганізмів, покращенням виходу продукту і зниженням витрат на масштабування виробництва. Рішення цих проблем полягає в генетичній модифікації мікроорганізмів, що дозволяє збільшити їх продуктивність, а також у інтеграції використання побічних продуктів, таких як гліцерин, для досягнення кращих результатів.

Отже, подальші наукові розробки в цій галузі відкривають можливості для ефективного та економічно вигідного виробництва бета-каротину на промисловому рівні, що матиме значний потенціал для застосування в різних галузях, зокрема в харчовій, фармацевтичній та косметичній промисловості.

Каротиноїди, завдяки своїй багатогранній біологічній активності, широко застосовуються в біомедичній сфері, причому бета-каротин займає в цьому важливе місце як біологічно активна сполука. На сучасному ринку домінують синтетичні препарати бета-каротину, тоді як продукти природного походження представлені у значно меншому обсязі. Проте ізоформи цис-бета-каротину, отримані з природних джерел, мають вищу ефективність у порівнянні із синтетичним алл-транс-бета-каротином. Це свідчить про перспективу масштабного використання мікроводоростей для видобутку та очищення природних цис-бета-каротинів у майбутньому.

Для підвищення ефективності екстракції каротиноїдів активно розробляються сучасні технології, серед яких важливе місце займає екстракція надкритичним вуглекислим газом. Ця технологія вже успішно використовується для видобутку каротиноїдів та інших біологічно активних речовин і має значний потенціал для застосування в майбутніх біологічних дослідженнях на клітинних і тваринних моделях. Ефективність екстракції залежить від конкретного методу, кожен із яких має свої унікальні особливості, переваги та недоліки.

Очікується, що в найближчі роки будуть впроваджені більш практичні та продуктивні технології екстракції, які дозволять удосконалити процеси вилучення природних біоактивних сполук, зокрема бета-каротину, для широкого використання у різних галузях науки і медицини.

Висновок до розділу 1

Аналіз даних наукової літератури продемонстрував, що бета-каротин є важливим природним пігментом із широким спектром застосувань у різних галузях, зокрема харчовій промисловості, медицині, косметології, кормовій індустрії та біотехнологіях. Його ключовою функцією є здатність перетворюватися на вітамін А, який необхідний для підтримки зору, імунітету та загального здоров'я. Завдяки антиоксидантним властивостям, бета-каротин активно використовується як для захисту шкіри від ультрафіолетового випромінювання, так і для уповільнення процесів старіння.

У харчовій промисловості бета-каротин слугує барвником і збагачувачем продуктів, особливо в регіонах із дефіцитом вітаміну А. Його біологічна доступність підвищується завдяки нанотехнологіям і генетичним модифікаціям. У фармацевтиці та косметології бета-каротин використовується для створення вітамінних препаратів, засобів відновлення після операцій, а також продуктів для догляду за шкірою та волоссям.

Кормова промисловість застосовує бета-каротин для поліпшення репродуктивних функцій у тварин, підвищення якості продукції та забезпечення її привабливого вигляду. Сучасні підходи до отримання бета-каротину включають як екстракцію з рослинної сировини, так і хімічний синтез, кожен із яких має свої переваги та обмеження.

Подальший розвиток технологій, таких як генна інженерія, ферментація і нанокапсуляція, дозволяє покращити ефективність отримання і використання бета-каротину. Це робить його незамінним компонентом у вирішенні глобальних викликів, пов'язаних із дефіцитом вітаміну А, а також у створенні інноваційних продуктів для промисловості та медицини.

РОЗДІЛ II

ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Характеристика мікроводоростей-продуцентів бета-каротину

Виробництво каротиноїдів із мікроводоростей охоплює кілька основних етапів, таких як культивування мікроводоростей, їх збір, екстракцію та очищення. Зазвичай процес отримання каротиноїдів передбачає збір біомаси, сушіння, руйнування клітин та подальшу екстракцію. Розрив клітинних стінок найчастіше здійснюється механічними методами, після чого каротиноїди виділяються за допомогою органічних розчинників. Крім цього, використовуються й інші підходи, зокрема екстракція розчинником під тиском, надкритична або субкритична рідинна екстракція, екстракція *in situ* та двофазна екстракція. Методи екстракції каротиноїдів із мікроводоростей активно досліджуються, що дозволило досягти певного прогресу в цій галузі. Ефективність отримання бета-каротину залежить як від загальної концентрації каротиноїдів у суміші, так і від усунення небажаних домішок[22].

Dunaliella salina (рис.2.1) є ключовим джерелом природнього бета-каротину мікробіологічного походження в промисловості. Для її вирощування необхідні специфічні умови - інтенсивне сонячне освітлення та високий рівень солоності води. Оптимальна концентрація хлориду натрію для забезпечення росту біомаси і синтезу β -каротину становить 24%. Зазвичай культивування здійснюють у відкритих басейнах, де продуктивність досягає 30–40 г сухої речовини з квадратного метра на добу. Швидкість синтезу бета-каротину залежить від розміру басейну і зменшується зі збільшенням його об'єму. Метод виділення бета-каротину визначається формою кінцевого продукту. Для отримання порошку, який містить 3% бета-каротину, біомасу піддають центрифугуванню і висушуванню. У разі виготовлення емульсії каротиноїдів барвник із водоростей екстрагують, очищують і поділяють за кольорами. Далі бета-каротин розчиняють у рослинних оліях.

Рис. 2.1 *Dunaliella salina*

Технологічний процес отримання бета-каротину з мікроводоростей *Dunaliella salina* (рис. 2.2) складається з кількох етапів. Спершу мікроводорості вирощують і збирають (етап 1), потім висушують (етап 2) і піддають дезінтеграції (етап 3). На четвертому етапі здійснюється екстракція каротиноїдів, що може виконуватися різними способами, такими як використання органічних розчинників, екстракція розчинником під тиском або надкритична рідинна екстракція, що базується на принципах сумісності розчинників. Надкритична рідинна екстракція забезпечує вибіркове виділення каротиноїдів шляхом регулювання щільності надкритичного CO₂. Завдяки високій швидкості дифузії та низькій в'язкості цього середовища час екстракції значно скорочується.

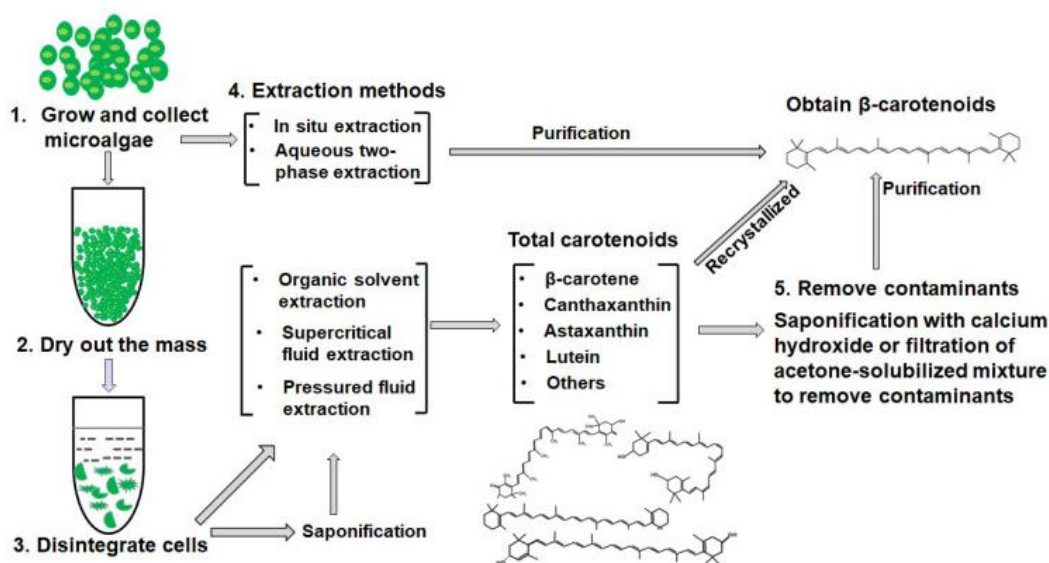


Рис. 2.2 Технологічний процес отримання бета-каротину з мікроводоростей

Для подальшого збагачення або очищення бета-каротину застосовуються методи двофазної екстракції *in situ* або водної двофазної екстракції. Також перед використанням розчинників можуть бути додані етапи омилення та фільтрації. На п'ятому етапі відбувається видалення хлорофілу через омилення за допомогою гідроксиду кальцію. Після цього нерозчинні домішки видаляють методом фільтрації, а бета-каротин очищають із застосуванням галогенованих вуглеводнів (наприклад, метиленхлориду) або гідрофобних розчинників (таких як н-гексан чи петролейний ефір). Як альтернативу, каротиноїди можна розчинити в чистому ацетоні та профільтрувати через мембрану з пористістю 0,45 мкм.

Методи екстракції *in situ* та двофазна екстракція дозволяють напряду отримувати бета-каротин, уникаючи етапи збору, сушіння або дезінтеграції клітин. У стресових умовах можливе селективне й безперервне вилучення бета-каротину шляхом додавання біосумісних органічних фаз до культури мікроводоростей.

Нижче описані основні екологічні умови для ефективного культивування *Dunaliella salina* (табл.2.1):

Таблиця 2.1

Екологічні умови для культивування *Dunaliella salina*

Екологічні умови	Опис
Солоність	<i>Dunaliella salina</i> є галофільною мікроводоростю, що означає, що вона добре розвивається в умовах високої солоності. Вона здатна витримувати концентрацію солі до 30%, що є важливою особливістю для її культивування в солоних водоймах, таких як морські озера або солоні ставки. Висока концентрація солі стимулює синтез бета-каротину в <i>Dunaliella salina</i> , оскільки в стресових умовах рослина активно накопичує цей антиоксидант у якості захисту

	від осмотичного стресу.
Температура	Ідеальна температура для росту <i>Dunaliella salina</i> коливається в межах від 20°C до 35°C. Вищі температури можуть прискорити метаболічні процеси, що веде до збільшення виробництва каротиноїдів, проте температура понад 40°C може бути шкідливою для організму. Мікроводорість добре адаптована до жаркого клімату, що дозволяє її вирощувати в теплих регіонах.
Освітленість	<i>Dunaliella salina</i> потребує інтенсивного світла для фотосинтезу, що стимулює синтез каротиноїдів, зокрема бета-каротину. Найкраще вона розвивається при рівні освітленості близько 150–200 мкмоль квіт.с/м ² . В умовах надлишку світла зростає концентрація бета-каротину, оскільки він виконує роль захисного фільтра від ультрафіолетового випромінювання. Проте важливо також враховувати рівень ультрафіолетового випромінювання, яке може спричиняти фотострес.
pH	<i>Dunaliella salina</i> добре розвивається при нейтральному або слабко лужному pH середовища (рівень pH 7–9). Зміни кислотності можуть значно вплинути на ріст та виробництво каротиноїдів цієї мікроводорості.

Chlorella vulgaris (рис.2.3) є однією з найвідоміших мікроводоростей, яка використовується для виробництва бета-каротину. Вона відома своєю здатністю накопичувати бета-каротин під час фотосинтетичних процесів, особливо коли вона піддається стресовим умовам, таким як обмеження поживних речовин або зміна освітленості. Однак її здатність до синтезу бета-каротину в

кількості, достатній для промислового виробництва, є меншою, ніж у *Dunaliella salina*.

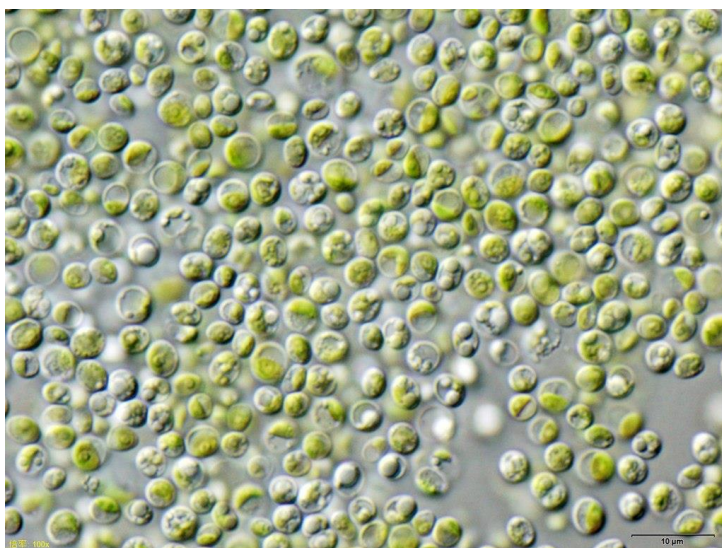


Рис.2.3 *Chlorella vulgaris*

Spirulina platensis (рис.2.4), хоча і вважається менш ефективним продуцентом бета-каротину в порівнянні з іншими мікроводоростями, все ж використовується в деяких випадках для його виробництва. Ця водорість має високу поживну цінність і здатна синтезувати бета-каротин, проте в основному її культивують для виробництва протеїнів та інших біологічно активних сполук.

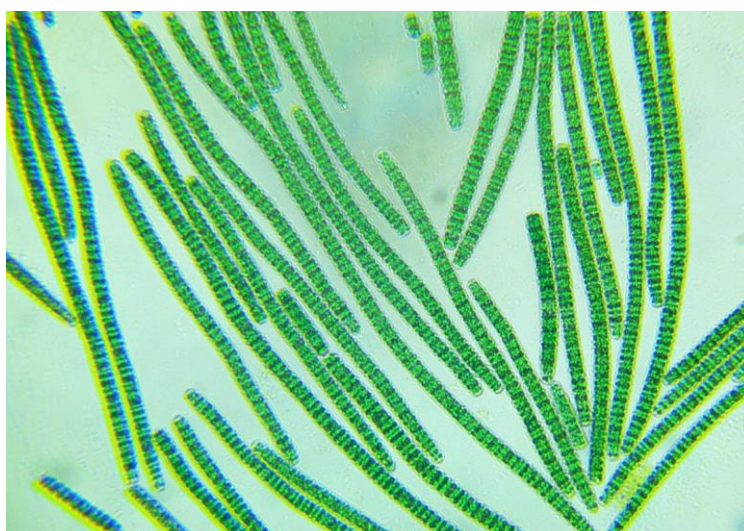


Рис. 2.4 *Spirulina platensis*

Haematococcus pluvialis (рис. 2.5) в першу чергу відома своїм здатністю синтезувати астаксантин, вона також здатна виробляти бета-каротин. Ця мік-

роводорість активно використовується для біотехнологічних досліджень і комерційного виробництва каротиноїдів, оскільки її продуктивність може бути значною при оптимальних умовах культивування.



Рис. 2.5 *Haematococcus pluvialis*

Chlorococcum citrinum (рис.2.6)– ще одна мікроводорість, яка може бути використана для виробництва бета-каротину. Вона активно накопичує каротиноїди, включаючи бета-каротин, і є перспективним кандидатом для біотехнологічних процесів, зокрема для виробництва натуральних антиоксидантів.



Рис. 2.6 *Chlorococcum citrinum*

Таким чином, різні мікроводорості мають різні екологічні вимоги та рі-

вень продуктивності щодо синтезу бета-каротину. Однак *Dunaliella salina* залишається одним з найбільш перспективних і ефективних продуцентів цього важливого каротиноїду, завдяки своїй здатності синтезувати його в значних кількостях за умов солонуватих і теплих середовищ.

2.2 Характеристика грибів-продуцентів бета-каротину

Гриби є важливими продуцентами каротиноїдів (табл. 2.2), про що свідчать численні дослідження. Вчені дослідили використання *Blakeslea trispora* для синтезу бета-каротину[5]. Інший вид пліснявих грибів, *Phycomyces blakesleeanus*, також демонструє здатність продукувати бета-каротин у промислових масштабах, що було підтверджено роботами науковців. Найбільш продуктивні штами *Phycomyces blakesleeanus* досягають пікового каротиногенного потенціалу в умовах без перемішування, що відрізняється від вимог штамів *Blakeslea trispora*[6].

Таблиця 2.2

Основні каротиноїди, які продукують гриби біотехнологічними методами

Гриб	Каротиноїд
<i>Blakeslea trispora</i>	Бета-каротин, лікопін
<i>Rhodospiridium sp.</i>	Торулен, бета-каротин
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	Бета-каротин
<i>Rhodotorula graminis</i>	Торулен
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Торулародин, бета-каротин, торулен
<i>Rhodotorula rubra</i>	Торулародин, бета-каротин, торулен
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Торулародин, бета-каротин, торулен
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Бета-каротин

Каротиноїди також продукуються дріжджами роду *Rhodotorula spp.* (рис.2.7), які широко поширені в природі. Ці дріжджі здатні синтезувати бета-каротин, торулен і торулародин у різних співвідношеннях. Продуктивність

Rhodotorula залежить від виду, складу поживного середовища та умов культивування. Вміст каротиноїдів у продукції дріжджів класифікується за рівнями: низький (менше 100 мкг/г), середній (101–505 мкг/г) та високий (понад 500 мкг/г), як зазначено в роботах багатьох авторів[23].



Рис. 2.7 *Rhodotorula*

Rhodotorula — це група дріжджів, які відомі своєю здатністю синтезувати каротиноїди, зокрема бета-каротин, торулен і торуларгодин. Ці дріжджі активно використовуються для виробництва природних каротиноїдів завдяки кільком особливостям їх метаболізму. Хоча *Rhodotorula spp.* не є фотосинтетичними організмами, вони здатні використовувати світло для стимуляції синтезу каротиноїдів у певних умовах. Дослідження показують, що при обмеженні доступу до азоту та при освітленні цей тип дріжджів активно синтезує бета-каротин. Світло сприяє активізації певних метаболічних шляхів, що збільшує кількість каротиноїдів. Ці дріжджі здатні до продукування органічних кислот (зокрема оцтової та молочної), що також може сприяти кращому засвоєнню поживних речовин та синтезу каротиноїдів. Важливою особливістю метаболізму *Rhodotorula spp.* є здатність використовувати ацетат і вуглеводи як основне джерело вуглецю, що активує шлях каротиноїдного біосинтезу. Під час метаболізму ацетату в клітинах дріжджів утворюються проміжні сполуки, які використовуються для синтезу каротиноїдів. У таблиці(табл.2.3) наведено умови культивування.

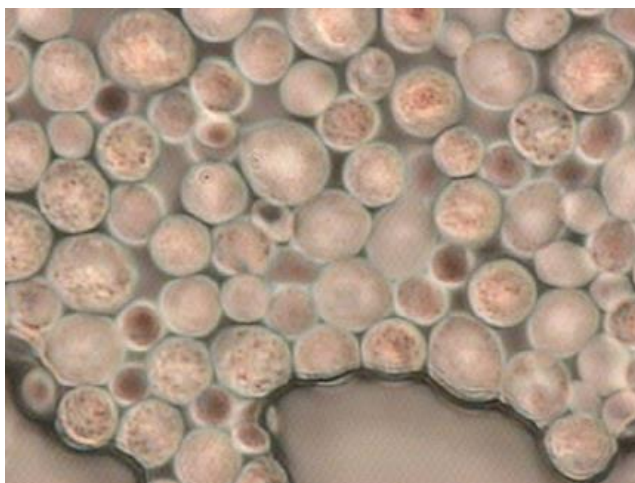
Таблиця 2.3

Екологічні умови для культивування *Rhodotorula*

Умова	Показник	Опис
Склад середовища	Вуглеводи, мікроелементи	Оптимальні умови для культивування <i>Rhodotorula</i> spp. включають середовище, багате вуглеводами (глюкоза, мальтоза) і мікроелементами (залізо, магній).
pH	pH 5.5-6.5	Важливим є контроль за рівнем pH середовища.
Температура	25–30°C	Зміна температури може впливати на швидкість синтезу каротиноїдів.

Нестача азоту стимулює синтез каротиноїдів у *Rhodotorula* spp. Зниження концентрації цього елементу в середовищі може привести до збільшення продукції бета-каротину. Використання світла (в залежності від штаму) може підвищити продуктивність каротиноїдів. Світло активує певні ферменти та стимулює метаболічні шляхи, що ведуть до синтезу каротиноїдів.

Інший важливий напрямок досліджень стосується дріжджів *Xanthophyllomyces dendrorhous* (рис.2.8), які використовуються для виробництва астаксантину. Для цього виду розроблені ефективні біотехнологічні процеси, що підтверджує надійність дріжджів як продуцентів каротиноїдів.

Рис.2.8 - *Xanthophyllomyces dendrorhous*

Xanthophyllomyces dendrorhous (раніше відомі як *Phaffia rhodozyma*) є дріжджами, які використовуються для виробництва астаксантину — одного з найпотужніших антиоксидантів серед каротиноїдів. Ці дріжджі також можуть синтезувати інші каротиноїди, зокрема бета-каротин, хоча їх основний акцент лежить на астаксантині.

Основні аспекти метаболізму цього виду дріжджів включають: використання вуглеводів і органічних кислот(*Xanthophyllomyces dendrorhous* активно використовує глюкозу, мальтозу та інші вуглеводи як основні джерела вуглецю для синтезу каротиноїдів. Міжнародні дослідження вказують, що при додаванні органічних кислот до середовища продукція каротиноїдів збільшується), стресові умови(наприклад, обмеження азоту), додавання ацетатної і молочної кислоти.

Для культивування *Xanthophyllomyces dendrorhous* застосовуються середовища, багаті вуглеводами, азотом і мікроелементами. Азот може бути обмежений для стимулювання синтезу каротиноїдів. Оптимальна температура для культивування цього виду дріжджів коливається в межах 25–30°C. Температура вищого рівня може зменшувати продуктивність каротиноїдів.

Для *Xanthophyllomyces dendrorhous* оптимальний рН знаходиться в межах 4.5–6.5, що дозволяє організмам синтезувати астаксантин та інші каротиноїди в оптимальних кількостях. Технологія культивування також включає контроль за рівнем кисню в середовищі. Продуктивність каротиноїдів може підвищуватися при збільшенні аерації, оскільки це сприяє кращому окисленню органічних субстратів і підвищенню активності ферментів.

Mucor circinelloides(рис. 2.9) є ще одним представником пліснявих грибів, здатних синтезувати каротиноїди, включаючи бета-каротин. При культивуванні на різних субстратах, таких як глюкоза або мальтоза, цей вид гриба також демонструє потенціал для виробництва каротиноїдів в промислових масштабах.



Рис. 2.9 *Mucor circinelloides*

Aspergillus terreus (рис.2.10) є видом гриба, який, окрім своїх інших біохімічних властивостей, здатний продукувати каротиноїди, зокрема бета-каротин. Культивування цього гриба в середовищі з високою концентрацією вуглеводів дозволяє досягати значних рівнів каротиноїдів. Також цей вид гриба активно досліджується як джерело природних антиоксидантів.



Рис.2.10 *Aspergillus terreus*

В таблиці(табл.2.4) наведено умови культивування грибів для виробництва бета-каротину.

Таблиця 2.4

Умови культивування грибів у виробництві бета-каротину

Умова	Показник	Опис
Температура	25–30°C	Температура є ключовим фактором для росту грибів і синтезу бета-каротину. Для більшості грибів, таких як <i>Blakeslea trispora</i> або <i>Phycomyces blakesleeanus</i> , оптимальна температура для культивування знаходиться в межах 25–30°C. При цьому температура понад 35°C може призвести до зниження росту грибів і зменшення продукції каротиноїдів. Важливою особливістю є те, що в стресових умовах, таких як підвищення температури, грибні культури можуть збільшувати продукцію каротиноїдів, зокрема бета-каротину, оскільки це є механізмом захисту від стресу. Однак температура понад 40°C зазвичай є шкідливою для росту грибів і може призвести до їх загибелі.
pH середовища	6,5–7,5	Гриби для синтезу бета-каротину, такі як <i>Blakeslea trispora</i> , найкраще ростуть при нейтральному pH середовищі, близькому до 6,5–7,5. Відомо, що зміни кислотності можуть сильно впливати на метаболізм грибів та продукцію каротиноїдів. Наприклад, зниження pH середовища до більш кислотного або підвищення до лужного

		може призвести до зниження кількості синтезованого бета-каротину. Для багатьох видів грибів важливо підтримувати стабільний рівень рН для досягнення високої продуктивності.
Концентрація субстрату	Від 1 до 5 г/л в залежності від штаму гриба та використовуваного середовища.	Для оптимального росту грибів і синтезу бета-каротину важливе значення має концентрація органічних субстратів, зокрема вуглеводів (глюкоза, мальтоза) або органічних кислот. У разі <i>Blakeslea trispora</i> концентрація вуглеводів у середовищі повинна бути достатньо високою, щоб підтримувати інтенсивний ріст, але не настільки високою, щоб викликати інгібування росту або синтезу каротиноїдів через осмотичний стрес. Оптимальні концентрації вуглеводів коливаються від 1 до 5 г/л в залежності від штаму гриба та використовуваного середовища. Важливою є також наявність мікроелементів (наприклад, магнію, калію, заліза), які стимулюють активний метаболізм і синтез каротиноїдів.
Інші фактори	В залежності від штаму.	Відношення світла та темряви також впливає на продукцію каротиноїдів у грибах. Деякі гриби потребують певної кількості світла для стимулювання синтезу бета-каротину, тоді як інші можуть розвиватися в темряві. Проте більшість грибів-продуцентів каротиноїдів, як і <i>Blakeslea</i>

		<i>trispota</i> , можуть виробляти бета-каротин як в умовах світла, так і без нього. Світло може сприяти збільшенню синтезу каротиноїдів в умовах оптимального фотосинтетичного або стресового навантаження.
--	--	--

Усі перелічені види грибів мають певні особливості в умовах культивування, які впливають на продукцію бета-каротину. Загалом, оптимальні умови для культивування грибів-продуцентів каротиноїдів включають контрольовану температуру, стабільний рН середовища, достатню концентрацію вуглеводів і правильне співвідношення світла та темряви. Продуктивність бета-каротину у грибах залежить від поєднання цих факторів, а також від використання спеціальних технологічних методів, таких як штучне освітлення або оптимізація складу субстрату.

2.3 Характеристика бактерій-продуцентів бета-каротину

Серед бактерій переважно продукується кантаксантин — каротиноїд, що знаходить застосування в птахівництві, рибному господарстві, косметичній та фармацевтичній галузях, а також у харчовій промисловості. Найбільш дослідженими бактеріями-продуцентами є *Corynebacterium michiganense*, *Micrococcus roseus*, *Brevibacterium spp.*, *Bradyrhizobium spp.*, *Gordonia jacobaea* та *Dietzia natronolimnaea* [12].

Mycobacterium phlei (рис.2.11), *M. stegmatis*, *M. lacticolum*, *M. rubrum*, *M. Brevicali* - родина мікобактерій має особливості метаболізму, що можуть сприяти синтезу каротиноїдів, зокрема бета-каротину. Ці бактерії належать до групи актиноміцетів і мають унікальну здатність до біосинтезу каротиноїдів завдяки певним метаболічним шляхам. Ці види можуть синтезувати каротиноїди у відповідь на стресові умови або через обмеження поживних речовин. У таких умовах ці мікроорганізми змінюють активність своїх метаболічних шляхів, включаючи біосинтез бета-каротину як адаптацію до стресу. Вони можуть продукувати органічні кислоти в умовах обмеженого живлення, що стимулює

синтез каротиноїдів. Як і багато інших організмів, мікобактерії можуть збільшувати продукцію каротиноїдів за умов обмеження азоту, оскільки це сприяє активації альтернативних метаболічних шляхів, що включають каротиноїди. Для культивування цих бактерій використовуються багаті поживні середовища, багаті на органічні вуглеводи (глюкоза, гліцерин), що є джерелами вуглецю. Також вони потребують додаткових мікроелементів, таких як магній і залізо. Оптимальна температура для розвитку мікобактерій становить 30–37°C, а pH середовища зазвичай варіює в межах 6.0–7.5.



Рис. 2.11 *Mycobacterium phlei*

Micrococcus glutamicus (рис.2.12), *M. roseum* - ці бактерії відомі своєю здатністю синтезувати різноманітні каротиноїди, включаючи бета-каротин. *Micrococcus glutamicus* синтезує каротиноїди через шляхи біосинтезу терпенів, в яких важливу роль відіграють ензими, що сприяють утворенню каротиноїдів з прекурсорних сполук, таких як фарнезилпірофосфат. Взаємодія з деякими факторами середовища може стимулювати експресію генів, які відповідають за синтез каротиноїдів. Для кращого виробництва каротиноїдів важливо використовувати середовище з високим вмістом органічних вуглеводів (глюкоза, мальтоза), а також необхідно забезпечити достатній рівень азоту та мікроелементів. Оптимальна температура для культивування цих бактерій становить 30–37°C, а pH середовища варіює від 6.0 до 7.5. Світло може активувати певні ферменти, які відповідають за біосинтез каротиноїдів.

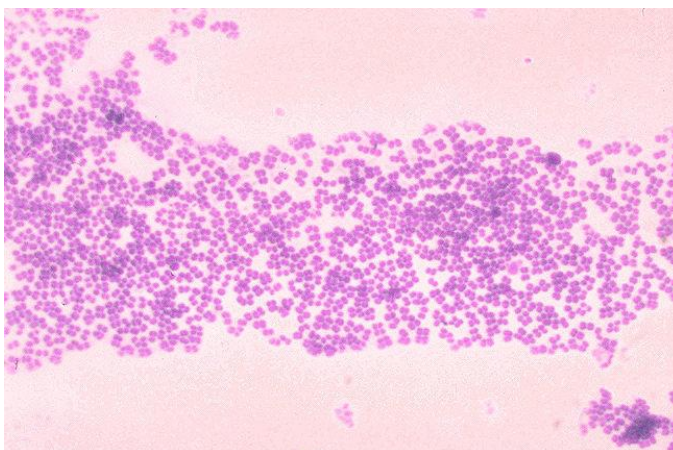


Рис. 2.12 *Micrococcus glutamicus*

Actinomyces aureomonopodiales, *A. chrysomallus* var. *carotinoides*, *A. Subflavus* - це актиноміцети, які можуть синтезувати каротиноїди, включаючи бета-каротин, завдяки їх здатності до використання складних органічних сполук як джерел вуглецю. Біосинтез каротиноїдів у цих організмах може бути стимульований за допомогою обмеження доступу до вуглецю або азоту, що активує шляхи синтезу терпенів. Вони можуть розвиватися в симбіозі з іншими організмами, сприяючи накопиченню каротиноїдів у своїх клітинах. Середовище повинно містити джерела вуглецю, такі як глюкоза чи маніт, а також мікроелементи (залізо, магній). Оптимальна температура становить 30–35°C, рН — 6.0–7.5. Умови обмеження азоту сприяють збільшенню продукції каротиноїдів[25].

Streptomyces mediolani - це бактерії, які мають здатність до синтезу каротиноїдів завдяки високій активності ферментів, що беруть участь у біосинтезі терпенових сполук. Стрептоміцети можуть синтезувати каротиноїди в умовах обмеження поживних речовин, зокрема азоту, що активує метаболічні шляхи, що включають каротиноїди. Важливо використовувати середовище з достатнім вмістом органічних сполук, таких як глюкоза або крохмаль, а також мікроелементів. Оптимальна температура для росту складає 28–30°C, рН середовища варіюється від 6.0 до 7.5. Обмеження азоту в середовищі, так само як і в попередніх випадках, є важливим чинником для стимуляції синтезу каротиноїдів.

Corynebacterium poinsetiae - це грампозитивні бактерії, що здатні до синтезу каротиноїдів, включаючи бета-каротин. Для культивування потрібно використовувати середовище з високим вмістом органічних вуглеводів і мікроелементів. Оптимальна температура 30–35°C, рН 6.0–7.5. Обмеження азоту.

Pseudomonas — це рід бактерій, які здатні синтезувати каротиноїди за рахунок терпенових шляхів. Середовище з доступом до вуглеводів, таких як глюкоза та інші органічні сполуки, а також мікроелементи для активізації синтезу каротиноїдів. Температура повинна бути в межах 28–30°C, рН 6.0–7.0 для оптимальної продуктивності.

Висновки до розділу 2

Такий різноманітний набір мікроорганізмів демонструє великий потенціал для виробництва каротиноїдів завдяки їх біохімічним властивостям і можливостям масштабування.

РОЗДІЛ III

ДОСЛІДЖЕННЯ ЩОДО ПРОМИСЛОВОГО ОТРИМАННЯ БЕТА-КАРОТИНУ

Ефективність біотехнологічного процесу в будь-якій системі визначається поживними та фізичними умовами культивування, які впливають як на ріст клітин, так і на синтез пігментів. Дослідження показують, що оптимальні умови для вироблення каротиноїдів часто не збігаються з умовами, сприятливими для росту клітин. Біосинтез каротиноїдів, а також кількісний і якісний склад цих сполук можуть змінюватися під впливом стресових факторів навколишнього середовища[26].

Отже, розуміння таких параметрів культивування, як температура, рівень аерації, рН, освітленість і склад поживного середовища, є критично важливим для створення умов, які стимулюють мікроорганізми до змін у продукції та складі каротиноїдів, що становлять інтерес. Крім того, аналіз усіх цих факторів є ключовим для розвитку промислових методів виробництва каротиноїдів з використанням біотехнологій. Для комерційної реалізації необхідно мінімізувати витрати на виробництво, збільшити вихід каротиноїдів і впровадити ефективніші методи їх екстракції, ізоляції та збереження[28].

3.1. Технологічний процес отримання бета-каротину з гриба *Blakeslea trispora*

Розглянемо технологічний процес отримання бета-каротину з гриба *Blakeslea trispora* – найпоширенішого у промисловому виробництві завдяки синергічному вирощуванню двох спор (+) та (-)[4]:

Стадія 1. Приготування живильних середовищ для посівного матеріалу. Середовище має містити вуглецеві джерела(глюкоза, мальтоза, кукурудзяний сироп), азотні джерела(кукурудзяний екстракт, соєвий борошняний гідролізат), магній, залізо, фосфор та інші. В нашому випадку для живильного середовища використано такі компоненти: вода, зелена кукурудзяна патока, кукурудзяний екстракт, фосфорнокислий калій. Компоненти додають до інокуля-

тора і перемішують, після чого проводять стерилізацію «гострою парою» протягом 30 хв.

Стадія 2. Приготування живильних середовищ для ферментації. Екстракт соєвого борошна, фосфорнокислий калій, соняшникова олія, кукурудзяне борошно, тіамін хлорид, пектини і воду змішують у ферментері, стерилізують «гострою парою», та за потреби регулюють рН соляною кислотою або натрій гідроксидом.

Стадія 4. Підготовка посівної культури. Кріоконсервовані культури висівають на тверде живильне середовище – суловий агар у стерильних пробірках. Інкують, перевіряють чистоту колоній. До пробірок додають рідке живильне середовище, утворюють клітинну суспензію, яку потім переносять у колби і ставлять на качалку, знову інкують.

Стадія 5. Вирощування посівної культури. Інокулятори заповнюють посівним матеріалом на 50%, біомасу культивують при температурі 28С протягом 36-72 годин з перемішуванням та барботажем повітря. Після культивування контроль.

Стадія 6. Біосинтез. У ферментер з живильним середовищем додають 5% посівної культури. Біосинтез триває до 72 годин при 28С. Температуру підтримують за допомогою подачі гарячої води до сорочки ферментера. Культивування вважається завершеним, коли концентрація цільового продукту становить 2000 мг/л. Рідина передається у збірник, де коригується рН.

Стадія 7. Осадження біомаси. У змішувальний реактор для відділення каротину з клітинної культури подається етанол у співвідношенні 1:1. Перемішування.

Стадія 8. Центрифугування. Отриману на попередній стадії рідину перемішують у центрифугу та відділяють тверду фазу – каротин.

Стадія 9. Очищення і кристалізація. У збірнику з твердою фазою і водою у співвідношенні 1:1 відбувається перемішування, після чого проводять вакуумне випарювання у спеціальному апараті. Після випарювання концентрація сухої маси – 65%.

Стадія 10. Осадження етилацетатом. У збірник з каротином подають розчин етилацетату, у якому каротин утворює чистий кристалічний осад. Розпилювальна сушарка висушує розчин, і отримують сухий екстракт бета-каротину.

Стадія 11. Пакування готового продукту. За допомогою пакувальної машини відбувається фасування, пакування, маркування і відвантаження готового бета каротину.

З описаної технології можна виділити наступні ключові характеристики:

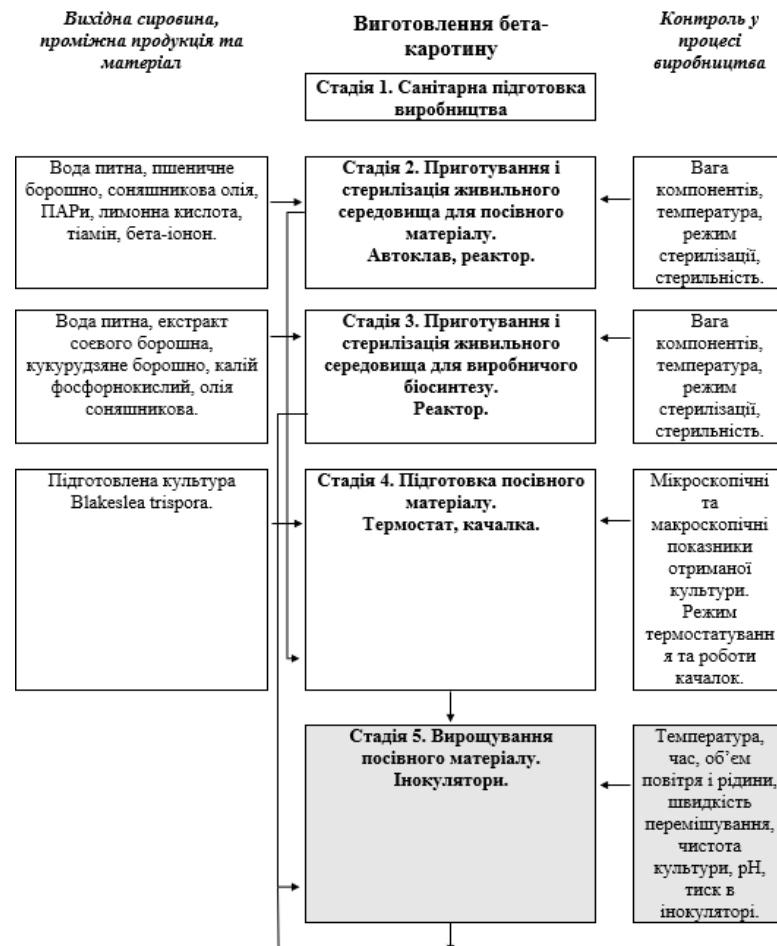
Тривалість процесу культивування – до 72 годин;

Температура культивування – 28 С;

Кінцевий продукт – порошок із вологістю 5%, придатний до зберігання на протязі 6 місяців.

Нижче наведено технологічну схему отримання бета-каротину – рис.

3.1.



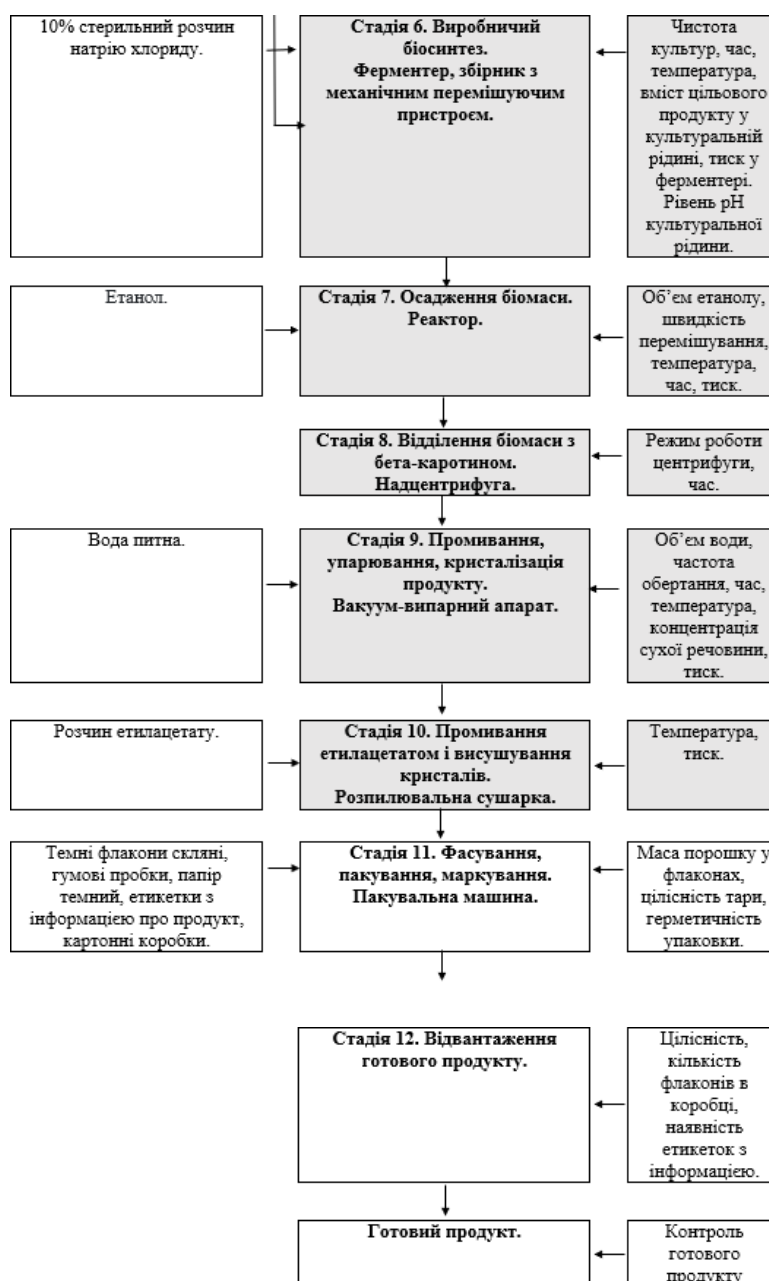


Рис. 3.1. - Виготовлення бета-каротину

3.2. Технологічний процес біосинтезу бета-каротину з мікроорганізму *Dunaliella salina*

Тепер розглянемо технологічний процес біосинтезу бета-каротину з мікроорганізму *Dunaliella salina*:

Стадія 1. Очищення води. Морську воду очищують за допомогою спеціальної решітки з ланцюговими граблями. Її конструкція включає сталеву раму, направляючі для роликового ланцюга та шестерні, які забезпечують рух

ланцюга. Особливістю є розташування рухомих деталей лише у верхній частині, що подовжує термін служби обладнання. Граблі очищають стрижні решітки у зворотному потоці, запобігаючи накопиченню сміття. Вібраційний пристрій полегшує скидання відходів у спеціальний контейнер.

Стадія 2. Підготовка культури. Попереднє вирощування культури *Dunaliella salina* відбувається в окремих басейнах. Початкову біомасу поміщають у невеликі резервуари з живильним середовищем, поступово переносячи у більшій ємності в міру її зростання. Цей процес повторюється до заповнення всіх виробничих басейнів.

Стадія 3. Культивування біомаси. Основний етап передбачає інтенсивне нарощування біомаси та стимулювання синтезу бета-каротину шляхом підвищення концентрації NaCl до 1 М. Культивування триває шість днів за температури 25 ± 3 °C, що є оптимальним для росту.

Стадія 4. Збір біомаси. Розчин з біомасою відкачують з басейнів насосом та подають на наступний етап переробки.

Стадія 5. Сепарація біомаси. Для розділення розчину використовують сепаратор. Відокремлена вода після очищення збагачується поживними речовинами і використовується повторно.

Стадія 6. Сушка. Вологу біомасу сушать у промислових сушарках. Температура не перевищує 60 °C, що запобігає руйнуванню бета-каротину. На виході отримують сухий продукт із вмістом бета-каротину на рівні 5% від сухої маси.

Стадія 7. Фасування та пакування. Суху біомасу фасують у герметичні мішки по 25 кг, а потім додатково пакують у паперові мішки. Готовий продукт зберігають до шести місяців при кімнатній температурі та вологості не вище 75%.

З описаної технології можна виділити наступні ключові характеристики:

Тривалість процесу культивування – 6 днів;

Температура культивування – 25 °C;

Кінцевий продукт – порошок із вологістю 12%, придатний до зберігання

на протязі 6 місяців.

Технологічну схему наведено нижче (рис.3.2).

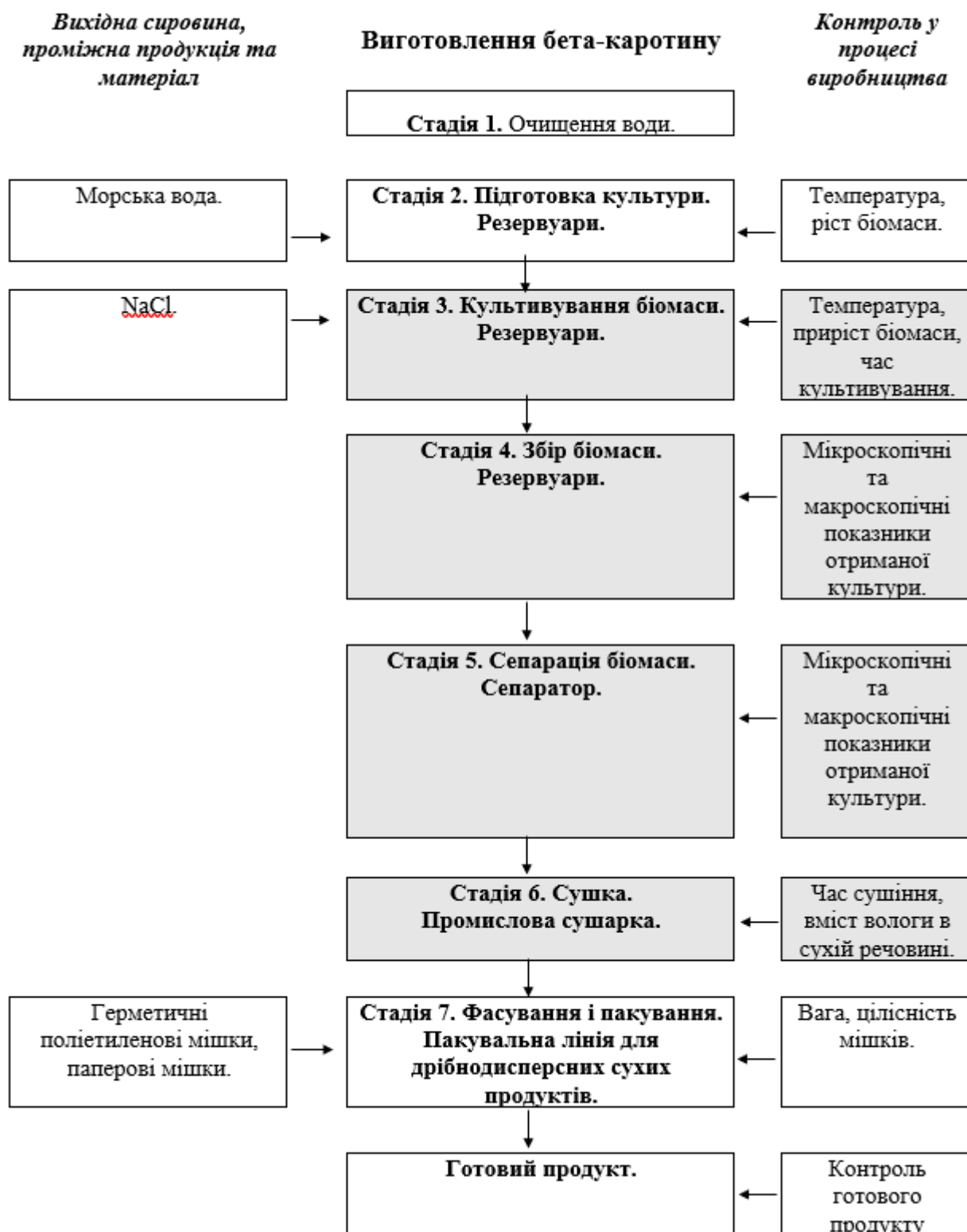


Рис. 3.2 – Технологічна схема отримання бета-каротину

Нами було проведено аналіз отримання бета-каротину від двох різних продуцентів за різними технологіями (табл. 3.3):

Таблиця 3.1

Порівняння процесів отримання бета-каротину

Характеристика	<i>Blakeslea trispora</i>	<i>Dunaliella salina</i>
Тип організму	Гриб	Мікроводорість
Живильне середовище	Багатокомпонентне середовище	Природня морська вода з додаванням NaCl
Температурний режим	28	22-28
Тривалість культивування	До 72 годин	6 діб
Процес стимуляції	Синергія двох спор, додавання етанолу та регулювання рН	Підвищення концентрації хлориду Натрія
Метод виділення продукту	Осадження етанолом, кристалізація	Сепарація, висушування
Сушіння	Вакуумне випарювання, розпилювальна сушарка	Промислові сушарки
Кінцевий продукт	Чистий кристалічний бета-каротин	Суха біомаса з вмістом бета-каротину

Висновки до розділу 3

Процес із *Blakeslea trispora* складніший і багатоступеневий, орієнтований на отримання висококонцентрованого чистого кристалічного бета-каротину. Він вимагає спеціалізованого обладнання (стадії з використанням етанолу, етилацетату, вакуумне випарювання). Процес із *Dunaliella salina* простіший, базується на природних умовах і потребує менше специфічних реагентів. Він підходить для масового виробництва бета-каротину у вигляді сухої біомаси.

Вибір методу залежить від кінцевих потреб - чистий продукт для фармацевтики чи біомаса для харчових добавок.

ВИСНОВКИ

1. Систематизовано дані наукових джерел щодо хімічної будови, властивостей та методів отримання каротиноїдів;
2. Узагальнено дані щодо характеристик бета-каротину, його застосування у різних галузях та методів отримання;
3. Проаналізовано дані наукової літератури щодо продуцентів бета-каротину та умов їх культивування;
4. Проведено порівняльний аналіз двох технологічних процесів отримання бета-каротину біотехнологічним методом.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Дмитруха Н. М., Лагутіна О. С., Короленко Т. К. Біотехнологічний бета-каротин, оцінка токсичності та безпечності *Екологічна безпека та природокористування*. 2019. № 2(30). С. 50-57. URL: <https:jrnل.nau.edu.ua/index.php/ecobiotech/article/view/16146/23404>. (дата звернення: 20.11.2024).
2. Бездрабко А. Д. Технологія виробництва вітаміну А. Дільниця біосинтезу : дипломний проєкт. Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2020. 128 с. URL: <https:ela.kpi.ua/bitstreams/3da47800-5eff-40e5-874e-5e9975e1a10f/download>. (дата звернення: 20.11.2024).
3. Пімінова Л. О. Ліпідний склад біотехнологічних препаратів каротину вітатону і вітадепсу. *Вісник СумДУ. Серія Медицина*. 2011. № 2. С. 13-17. URL: <https:essuir.sumdu.edu.ua/bitstream/123456789/24229/1/2.pdf>. (дата звернення: 20.11.2024).
4. Манжос, О. Технічне переоснащення виробництва β -каротину : кваліф. робота / наук керівник Ю. Азаренко. Харків, 2023. 95 с.
5. Дмитруха Н. М. Оцінка безпечності 9799% β -каротину "Лус-О-Beta" з гриба *Blakeslea trispora*. *Наукові праці ТНТУ*. 2023. № 1(93). С. 112-118.
6. Кравчук М. В., Бєлих І. А. Біотехнологічне виробництво β -каротину з використанням мукорового грибу *Blakeslea trispora*. *Вісник НТУ "ХПІ"*. 2015. № 45(1148). С. 56-61.
7. Августиневич С. О. Біотехнологія синтезу первинних метаболітів. URL: https://elib.lntu.edu.ua/sites/default/files/elib_upload/%D0%90%D0%B2%D0%B3%D1%83%D1%81%D1%82%D0%B8%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B8%D1%87/page18.html. (дата звернення: 20.10.2024).
8. Ірклієнко Н. П. Біотехнологічне виробництво жиророзчинних вітамінів: кваліфікаційна робота. Київ : НУХТ, 2021. 90 с.
9. Бета-каротин. Велика українська енциклопедія. URL: <https:vue.gov.ua/Бета-каротин> (дата звернення: 05.01.2025).

- 10.Донченко Г. В. Аналіз винахідницької діяльності відділу біохімії вітамінів та коензимів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України за період 1980-2015 рр. *Український біохімічний журнал*. 2016. Т. 88, № 2. С. 515.
- 11.Іванова В. Д., Сімахіна Г. О. Технологія природних вітамінів: навч. посіб. Київ : НУХТ, 2015. 343с.
- 12.Велигодська А. К., Федотов О. В. Отримання та аналіз препаратів каротиноїдів деяких штамів ксилотрофних базидоміцетів *Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія*. 2016. № 24(2). С. 290-294.
- 13.Харчові та дієтичні добавки, прянощі та приправи у продукції ресторанного господарства : підручник / В.Ф.Доценко, та ін. Київ : НУХТ, 2014. 379с.
- 14.Functions, therapeutic applications, and synthesis of retinoids and carotenoids / R. Álvarez et al. *Chemical Reviews*, 2014. Vol. 114(1). P. 1-125.
- 15.Black H. The role of nutritional lipids and antioxidants in UV-induced skin cancer. *Frontiers in Bioscience*. 2015. Vol. 7(1). P. 30-39.
- 16.Microbial Pigments in the Food Industry—Challenges and the Way Forward / T. Sen et al. *Front. Nutr.* 2019. Vol. 6. P. 7. DOI: 10.3389/fnut.2019.00007
- 17.Technological Aspects of β -Carotene Production *ResearchGate*. URL: https://www.researchgate.net/figure/Main-microorganisms-bcarotene-producers_tbl1_225435933. (Date of access: 20.11.2024).
18. Review of methods for analysis of carotenoids / K. Amorim-Carrilho et al. *Trends in Analytical Chemistry*. 2014. Vol. 56. P. 49-73.
- 19.Eroglu A., Harrison E. H. Carotenoid metabolism in mammals, including man: formation, occurrence, and function of apocarotenoids. *Journal of Lipid Research*. 2013. Vol. 54(7). P. 1719-30.
- 20.Ludmila Bogacz-Radomska, Joanna Harasym, β -Carotene—properties and production methods. *Food Quality and Safety*. 2018. Vol. 2(2). DOI: 10.1093/fqsafe/fyy004.

21. *Wartość odżywcza wybranych produktów spożywczych i typowych potraw* / H. Kunachowicz et al. Kraków : Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2015. 150 p.
22. Lipid and carotenoid synthesis by *Rhodospiridium diobovatum*, grown on glucose versus glycerol, and its biodiesel properties / N. Nasirian et al. *Canadian Journal of Microbiology*, 2018. Vol. 64. P. 277-289.
23. Nasrabadi M. R., Razavi S. H. Optimization of β -carotene production by a mutant of the lactose-positive yeast *Rhodotorula acheniorum* from whey ultrafiltrate. *Food Science and Biotechnology*. 2011. Vol. 20(2). P. 445-454.
24. Xavier A. A., Pérez-Gálvez A. Carotenoids as a Source of Antioxidants in the Diet Sub-cellular biochemistry. 2016. DOI: 10.1007/978-3-319-39126-7_14.
25. Greater serum carotenoid concentration associated with higher bone mineral density in Chinese adults / Z. Q. Zhang et al. *Osteoporosis International*. 2016. Vol. 27(4). P. 1593-1601.
26. Genetic engineering of *Nannochloropsis oceanica* to produce canthaxanthin and ketocarotenoids / D. Canini et al. *Microbial cell factories*. 2024. Vol. 23(1). P. 322. DOI: 10.1186/s12934-024-02599-4/.
27. Intron *RPS25Ai*, a Novel DNA Element, Has Global Effects on Synthetic Pathway Engineering by Empowering Protein Synthesis / M. Lv et al. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2024. Vol. 72(51). DOI: 10.1021/acs.jafc.4c11278/.
28. Biotechnological Production of Carotenoids Using Low Cost-Substrates Is Influenced by Cultivation Parameters: A Review / W. S. Igreja et al. *Int J Mol Sci*. 2021. Vol. 22(16). P. 8819. DOI: 10.3390/ijms22168819.
29. Sandmann G. Origin and evolution of yeast carotenoid pathways. *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids*. 2024. Vol. 1870(2). P. 159586. DOI: 10.1016/j.bbalip.2024.159586.
30. Industrially Important Fungal Carotenoids: Advancements in Biotechnological Production and Extraction / T. Naz et al. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*. 2023. Vol. 9(5). P. 578. DOI: 10.3390/jof9050578.

31. Biotechnological production of β -carotene using plant in vitro cultures / L. Almagro et al. *Planta*. 2022. Vol. 256(2). P. 41. DOI: 10.1007/s00425-022-03953-9/.

Додатки

Публікації за темою роботи



Міністерство
охорони здоров'я
України

Національний
фармацевтичний
університет



СЕРТИФІКАТ

Цим засвідчується, що

Манжос О.

Науковий керівник:
Хохленкова Н. В.

брав(ла) участь у роботі IV Всеукраїнської
науково-практичної конференції
з міжнародною участю

**YOUTH
PHARMACY
SCIENCE**

Ректор НФаУ,
д. фарм. н., проф.



Алла КОТВИЦЬКА

10-11 грудня 2024 р.
м. Харків,
Україна

СУЧАСНІ МЕТОДИ ОТРИМАННЯ БЕТА-КАРОТИНУ

Манжос О.

Науковий керівник: Хохлаєва Н. В.

Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна
hohnatal@gmail.com

Вступ. Бета-каротин — це природний каротиноїд, який відіграє важливу роль у біохімічних процесах організму, зокрема як попередник вітаміну А. Він також є незамінним харчовим барвником і має антиоксидантні властивості, що робить його затребуваним у харчовій, фармацевтичній та косметичній промисловості. Отримання β-каротину здійснюється кількома способами: екстракція з рослинної сировини, хімічний синтез і мікробний біосинтез. Незважаючи на поширення традиційних методів, вони мають низку обмежень, таких як висока вартість, сезонність рослинної сировини, низька стабільність продукту та обмежені можливості стандартизації. Біотехнологічні підходи, засновані на використанні мікроорганізмів, виявилися перспективними для промислового виробництва β-каротину завдяки їх екологічності, стабільності та високій ефективності.

Мета дослідження. Дослідити існуючі методи виробництва β-каротину, обґрунтувати доцільність впровадження біотехнологічних процесів на основі мікроорганізмів.

Матеріали та методи. Методика дослідження передбачала порівняльний аналіз різних технологій виробництва β-каротину з оцінкою їх ефективності, економічності та впливу на якість кінцевого продукту.

Результати дослідження. В результаті аналізу наукових джерел було встановлено, що основними недоліками традиційних методів екстракції β-каротину з рослинної сировини, включаючи їх етапи: подрібнення, пресування, седиментацію, центрифугування, екстракцію розчинниками та кристалізація, є низька ефективність, сезонність сировини та значні витрати. Наприклад, із 50 кг моркви отримують лише 2 г кристалічного β-каротину.

Хімічний синтез β-каротину, що базується на реакціях Віттіга та використанні реактивів Гріньяра, є технологічно зручним, але має потенційні ризики, такі як канцерогенність синтетичних сполук.

Біотехнологічні підходи, що включають використання мікроорганізмів: водоростей (*Dunaliella salina*), грибів (*Blakeslea trispora*), бактерій (*Rhodococcus maris*, *Rhodobacter sphaeroides*) та дріжджів, є безпечними та найбільш продуктивними, а отримуваний продукт є стабільним. За рахунок генетичної модифікації ці організми постійно вдосконалюються для підвищення економічності, ефективності та екологічності процесу.

Наприклад, дріжджі та бактерії модифікують для оптимізації біосинтетичних шляхів отримання β-каротину. У таких системах генетично змінюються шляхи синтезу ізопrenoїдів, щоб оптимізувати виробництво попередника каротиноїдів.

Водорості, особливо *Dunaliella salina*, вважаються одним із найбільш ефективних природних продуцентів. У відповідь на стресові умови, такі як високий рівень солі або світла, водорості накопичують значні кількості бета-каротину.

Висновки. Мікробний біосинтез β-каротину є найперспективнішим методом завдяки низькій собівартості, стабільності кінцевого продукту та відсутності залежності від сезонності сировини. Модернізація виробничого обладнання та впровадження інноваційних підходів, таких як додавання стрес-факторів і використання сучасних технологій кристалізації, значно підвищують ефективність виробництва. Застосування біотехнологічних методів забезпечує стабільну якість продукту, знижує екологічне навантаження та відповідає вимогам сучасного ринку.