

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет медико-фармацевтичних технологій
Кафедра біотехнології

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**на тему: «ОРГАНІЗАЦІЯ ВИРОБНИЦТВА КАРОТИНОЇДНОГО
ПІГМЕНТУ ЛЮТЕЇНУ МІКРОБНИМ СИНТЕЗОМ»**

Виконав : здобувач вищої освіти групи БТ621(3,10д)-02
спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія
освітньої програми Біотехнологія
Данило КАЛЮЖНИЙ

Керівник: Професор закладу вищої освіти кафедри
біотехнології, д.б.н., проф.
Ольга ФІЛІПЦОВА

Рецензент: Завідувачка кафедри біотехнології, біофізики та
аналітичної хімії Національного технічного університету
«Харківський політехнічний інститут», д.т.н., проф.
Ольга БЛИЗНЮК

Харків – 2025 рік

АНОТАЦІЯ

У роботі розроблено біотехнологічний процес отримання лютеїну з рекомбінантної *Pantoea stewartii* з геном лікопен ϵ -циклази, що забезпечує вихід 43,768 г лютеїну із 168 кг біомаси за цикл роботи одного виробничого ферментеру. Процес включає культивування з використанням оптимізованого середовища, екстракцію комбінацією розчинників (гексан:ацетон:етанол 2:1:1) з антиоксидантним захистом (0,1% токоферолу) та стабілізацію 10% мальтодекстрином. Розраховано об'єми апаратів. Встановлено систему контролю якості та проаналізовано екологічний вплив із пропозиціями регенерації розчинників та біоочищення стоків. Результати мають практичне значення для промислового виробництва лютеїну в Україні, сприяючи імпортозаміщенню та сталому розвитку

Ключові слова: лютеїн, мікробний синтез, рекомбінантна *Pantoea stewartii*.

ANNOTATION

The work developed a biotechnological process for obtaining lutein from recombinant *Pantoea stewartii* with the lycopene ϵ -cyclase gene, which provides an output of 43.768 g of lutein from 168 kg of biomass per cycle of one production fermenter. The process includes cultivation using an optimized medium, extraction with a combination of solvents (hexane:acetone:ethanol 2:1:1) with antioxidant protection (0.1% tocopherol) and stabilization with 10% maltodextrin. The volumes of the apparatus were calculated. A quality control system was established and the environmental impact was analyzed with proposals for solvent regeneration and wastewater biotreatment. The results have practical significance for the industrial production of lutein in Ukraine, contributing to import substitution and sustainable development.

Key words: lutein, microbial synthesis, recombinant *Pantoea stewartii*.

ЗМІСТ

Вступ.....	3
1 Аналітичний огляд.....	5
1.1 Аналіз біотехнологічних підходів до мікробного синтезу лютеїну	6
1.2 Технологічні аспекти виробництва лютеїну мікробним синтезом	11
1.3 Обґрунтування мікроорганізму для виробництва лютеїну та перспективності реалізації технології на вітчизняному підприємстві	14
2 Характеристика готового продукту, сировини, матеріалів, напівпродуктів.....	17
2.1 Характеристика готового продукту.....	17
2.2 Характеристика сировини.....	21
2.3 Характеристика біологічного об'єкту.....	24
2.4 Біосинтез цільового продукту.....	30
3 Технологічна частина.....	36
3.1 Розрахунок витрат компонентів.....	36
3.2 Обґрунтування та вибір обладнання	47
3.3 Опис технологічного процесу.....	49
3.4 Схеми виробництва.....	51
3.5 Контроль виробництва.....	55
3.6 Екологічні аспекти виробництва.....	57
Висновок.....	60
Список використаної літератури.....	61
Додатки.....	66

					162.02.06.00 000 ПЗ			
Змн..	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Калюжний				Організація виробництва каротиноїдного пігменту лютеїну мікробним синтезом Пояснювальна записка	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевірив	Філіпцова						2	60
.						НФаУ Кафедра біотехнології		
Н. контр.								
Затвердив	Хохленкова							

ВСТУП

Актуальність теми. Тема біотехнологічного виробництва лютеїну з рекомбінантної *Pantoea stewartii* є актуальною у контексті зростання попиту на природні антиоксиданти та біоактивні сполуки в фармацевтичній, косметичній та харчовій промисловостях. Лютеїн, відомий своїми властивостями захисту зору та антиоксидантною дією, традиційно отримують з рослинних джерел, що є трудомістким і малоефективним процесом. Використання мікробіологічного синтезу з генетично модифікованих штамів, таких як *Pantoea stewartii* з геном лікопен ϵ -циклази, дозволяє підвищити вихід продукту та зменшити екологічний вплив. З огляду на обмеженість природних ресурсів і необхідність сталого розвитку, розробка оптимізованого процесу з використанням агропромислових відходів (м'яса, кукурудзяний гідролізат) та екстракції з комбінацією розчинників (гексан:ацетон:етанол) є пріоритетним завданням. Актуальність посилюється потребами українського ринку в імпортозаміщенні та інтеграцією біотехнологій у національну економіку.

Метою роботи є розробка та оптимізація біотехнологічного процесу отримання лютеїну з рекомбінантної *Pantoea stewartii* із реалізацією процесу на вітчизняному підприємстві.

Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити наступні **завдання**:

Проаналізувати сучасні наукові джерела щодо біосинтезу лютеїну та оптимізації мікробіологічних процесів виробництва.

Описати біооб'єкт дослідження, фізіолого-біохімічні властивості *Pantoea stewartii*, її потенціалу для біосинтезу лютеїну та умов культивування.

Описати технологічний процес виробництва лютеїну на основі рекомбінантної *Pantoea stewartii*, включаючи етапи культивування, екстракції

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
						3
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

комбінацією розчинників, очищення, ліофілізації та пакування.

Підібрати та розрахувати необхідне технологічне обладнання на ділянці ферментації.

Скласти технологічну та апаратурну схеми виробництва, що відображають послідовність і умови реалізації біотехнологічного процесу.

Визначити точки контролю якості на кожному етапі технологічного процесу.

Оцінити екологічний вплив процесу та запропонувати рішення щодо зменшення впливу на довкілля.

Об'єктом дослідження є біотехнологічний процес отримання лютеїну з рекомбінантною *Pantoea stewartii* з геном лікопен ϵ -циклази.

Предметом дослідження є технологічні параметри, умови культивування, екстракції та стабілізації лютеїну, а також їх вплив на вихід, якість і екологічну безпеку процесу.

Методи дослідження включають: аналітичні, математичні та графічні.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані результати мають практичне значення для впровадження біотехнологічного виробництва лютеїну в Україні. Розроблений процес дозволяє створити конкурентоспроможний продукт для фармацевтичної та харчової індустрій. Використання агропромислових відходів сприяє циклічній економіці, а оптимізована екстракція з регенерацією розчинників знижує екологічний вплив. Рекомендації щодо контролю якості та управління відходами можуть бути інтегровані в промислове виробництво, сприяючи імпортозаміщенню та сталому розвитку біотехнологій.

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
						4
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

1 АНАЛІТИЧНИЙ ОГЛЯД

1.1 Аналіз біотехнологічних підходів до мікробного синтезу лютеїну

Лютеїн, каротиноїдний пігмент, що природно міститься в зелених рослинах, є цінним біоактивним компонентом, який використовується як кормова добавка для покращення забарвлення продуктів тваринного походження (наприклад, яєць і м'яса птиці), а також як функціональний інгредієнт у харчовій промисловості та для профілактики вікової макулярної дегенерації [37]. Лютеїн дозволений до використання в Україні як харчовий барвник з позначкою E161b (жовто-помаранчевий).

За своєю хімічною структурою каротиноїди належать до ізопреноїдних вуглеводнів із молекулярною формулою $C_{40}H_{56}$. Вони поділяються на дві основні категорії [25]:

- каротини - це ізопреноїдні вуглеводні, що не містять атомів кисню, до прикладу лікопен і β -каротин;
- ксантофіли - це похідні каротинів, які містять кисень, наприклад, лютеїн та зеаксантин.

Серед ксантофілів найчастіше зустрічається лютеїн (зазвичай у комплексі із зеаксантином), а разом із β -каротином вони є найрозповсюдженішими серед усіх каротиноїдів. Обидві групи - каротини й ксантофіли — мають подібну структуру, оскільки належать до каротиноїдів, однак ксантофіли відрізняються наявністю кисневих атомів, тоді як каротини — це виключно вуглеводні без кисню. Саме кисень надає ксантофілам більшої полярності порівняно з каротинами, що обумовлює їхнє розділення в процесах хроматографічного аналізу [27]. Зазвичай у ксантофілах кисень присутній у вигляді гідроксильних груп (рис. 1.1). Яскраве забарвлення цих сполук

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		5

пояснюється наявністю в їхній молекулярній структурі системи спряжених π -зв'язків, які функціонують як хромофори.

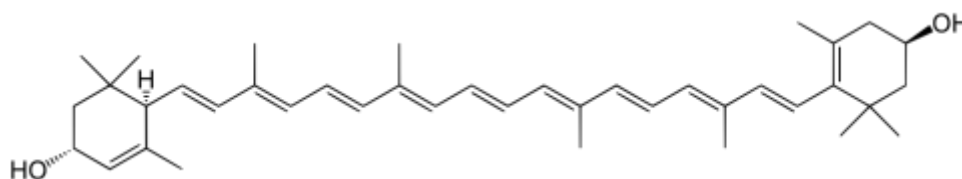


Рис. 1.1 – Структурна формула ксантофілу лютеїну (β , ϵ -каротин-3, 3'-діол)

Каротиноїди не розчиняються у воді, проте добре розчиняються у жирах і органічних розчинниках [25]. Деякі представники каротинів є попередниками вітаміну А, тоді як ксантофіли не мають такої активності.

До основних типів ксантофілів (позначених як Е 161) належать:

- криптоксантин Е161с - міститься в кукурудзі, зеленому перці, хурмі, папаї, цитрусових, чорносливі, яблуках, абрикосах, паприці, м'ясі птиці;
- зеаксантин Е161h - присутній у шпинаті, паприці, кукурудзі, деяких фруктах;
- лютеїн Е161b - наявний у зелених рослинах, кукурудзі, картоплі, шпинаті, моркві, помідорах, фруктах;
- кантаксантин Е161g - міститься в грибах, форелі, ракоподібних;
- кроцетин Е164 - у шафрані;
- капсантин - у червоному перці та паприці.

У рослинах каротиноїди розташовуються або в хлоропластах зелених частин рослини разом із хлорофілом (який часто приховує їхню присутність), або в хромопластах інших тканин, наприклад, у пелюстках квітів [22, 40]. Темно-зелені листові овочі, як-от капуста кале (до 0,25 мг/г свіжої маси) і шпинат (до 0,12 мг/г), мають високу концентрацію лютеїну. Пелюстки чорнобривців містять до 8,5 мг/г свіжої маси, завдяки чому їх активно використовують у промисловості для виробництва лютеїну.

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		6

Тварини отримують каротиноїди виключно з рослинної їжі, оскільки самотійно синтезувати ці сполуки вони не здатні. У людей лютеїн міститься в жовтій плямі разом із зеаксантином завдяки їх надходженню з їжею. Вважається, що лютеїн захищає очі людини від фотоокислювальних пошкоджень, фільтруючи високоенергетичне синє світло та запобігаючи таким очним захворюванням, як вікова макулярна дегенерація та катаракта. Цей пігмент також присутній в інших тканинах людини і вважається, що він захищає шкіру від пошкоджень, викликаних ультрафіолетовим випромінюванням, та знижує ризик серцево-судинних захворювань, таких як атеросклероз. Таким чином, лютеїн зараз комерційно виробляється для застосування як харчовий барвник та функціональна добавка, обумовлюючи найвище використання серед каротиноїдів - світова ринкова вартість лютеїну становить близько 300 мільйонів доларів [27].

Окрім рослин, до біосинтезу каротиноїдів здатні деякі види дріжджів родини *Rhodotorula*, зокрема роди *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces*, *Cryptococcus* [35]. У макулі ока людини містяться лютеїн і зеаксантин. Жовтому кольору яєчний жовток завдячує переважно цим двом ксантофілам, а також у меншій мірі β -каротину. Каротиноїди, що надають жовтуватого відтінку тваринному жиру, також надходять до організму з їжею рослинного походження [20].

Традиційно лютеїн отримують шляхом екстракції з рослинних джерел, таких як квіти нагідок (*Tagetes erecta*) або зелені овочі (шпинат, капуста кале). Однак цей метод є трудомістким, залежить від сезонності сировини та має низьку ефективність. Альтернативою є мікробний синтез лютеїну, який дозволяє організувати стабільне, контрольоване та економічно вигідне виробництво [25]. Для промислового виробництва лютеїну використовують генно-модифіковані штами мікроорганізмів, серед яких є ті, які здатні в природі продукувати лютеїн у незначних кількостях, і ті, які його не виробляють [32].

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		7

Серед бактерій використовують: *Pseudomonas* *vulneris* (спочатку ідентифікована як *Escherichia vulneris*) і *Escherichia coli*, які є добре вивченими модельними організмами, легкими для генетичної маніпуляції, але потребують введення повного біосинтетичного шляху для каротиноїдів; *Pantoea stewartii* (раніше *Erwinia stewartii*) - природно продукує зеаксантин, що спрощує модифікацію для синтезу лютеїну; бактерії роду *Rhodobacter*, такі як *Rhodobacter sphaeroides* і *Rhodobacter capsulatus* - фотосинтетичні бактерії з внутрішньоклітинними мембранами, які сприяють накопиченню каротиноїдів; архебактерії, такі як *Halobacterium salinarum*; види флавобактерій, такі як *Xanthobacter autotrophicus* та *Flavobacterium multivorum* [19, 23, 26, 31, 33, 34]. Серед водоростей застосовують *Haematococcus pluvialis*, *Dunaliella salina*, *Chlorella protothecoides* та *Neosporangium excentrum*, які продукують незначні кількості лютеїну, але можуть бути модифіковані для підвищення виходу [27, 29]. Дріжджі, зокрема *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) та *Saccharomyces cerevisiae*, та гриби, такі як *Neurospora crassa*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Blakeslea trispora* та *Aspergillus* *sp.* є перспективними, але менш дослідженими для лютеїну, технології відпрацьовані для інших каротиноїдних пігментів, зокрема астаксантину [35, 41]. Експериментальні дані підтверджують ефективність *E. vulneris* і *P. stewartii* для синтезу лютеїну після трансформації геном лікопен ϵ -циклази, з піками лютеїну на хроматограмах при 6,62 хвилини (порівняно з зеаксантином при 7,27 хв) [33, 34].

Для створення генно-модифікованих мікроорганізмів, здатних до біосинтезу лютеїну, описують використання гена лікопен ϵ -циклази, ізольованого зі шпинату (*Spinacia oleracea*) [33, 34]. Цей фермент каталізує утворення ϵ -кільця в молекулі лікопену, що призводить до утворення δ -каротину, який згодом перетворюється на α -каротин і лютеїн за участю лікопен β -циклази та β -каротин гідроксилази [41]. Унікальною особливістю є здатність одного поліпептиду (гідроксилази) в мікроорганізмах каталізувати

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		8

гідроксилювання як β -, так і ϵ -кільця α -каротину, на відміну від рослин, де для цього потрібні два окремі ферменти (рис. 1.1).

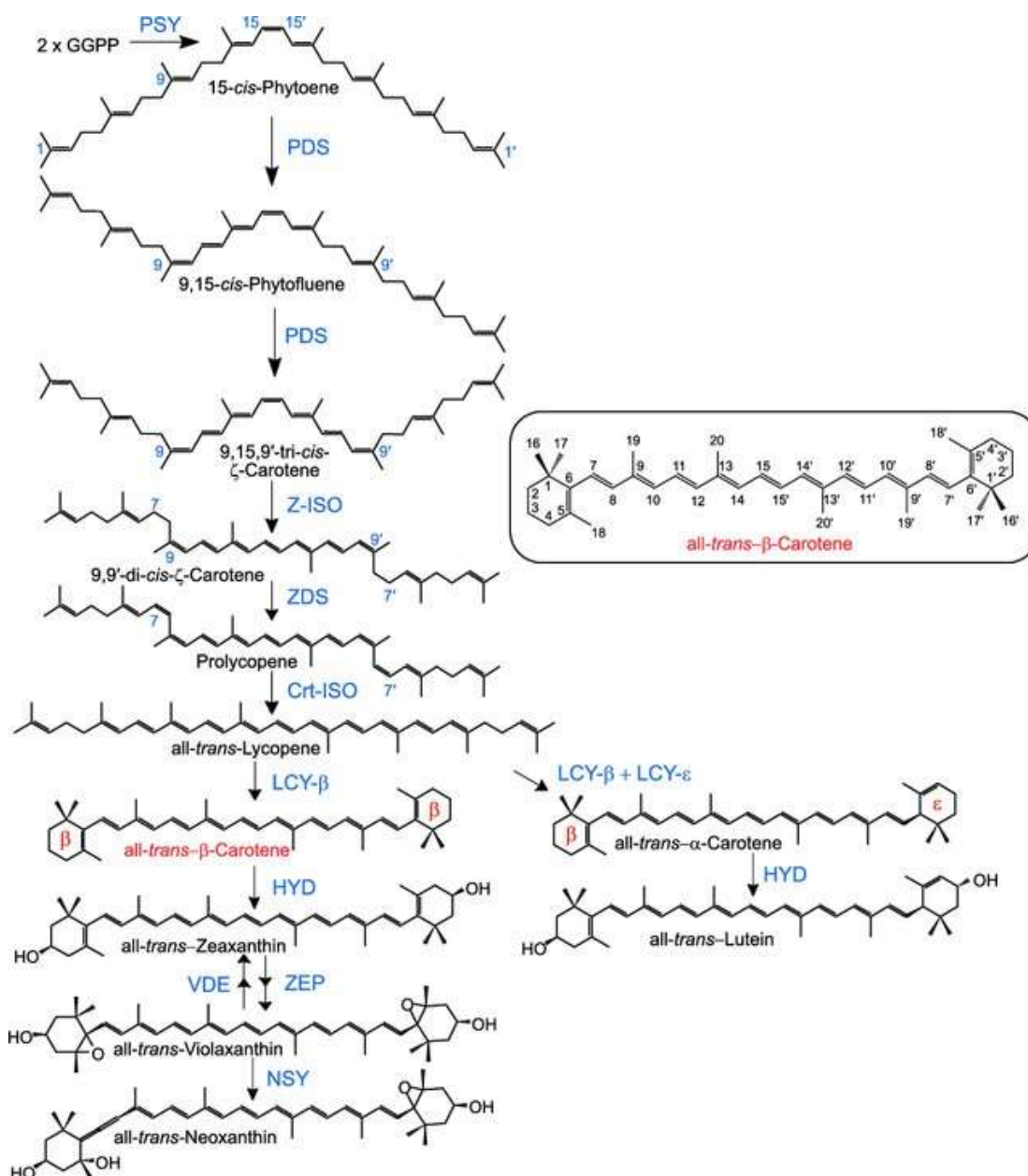


Рис. 1.1 - Біосинтез каротиноїдів у рослинах: для утворення α -каротину потрібні лікопен- β -циклаза (LCY- β) та лікопен- ϵ -циклаза (LCY- ϵ), які вводять відповідно β - та ϵ -іононове кільце

(Джерело: From Carotenoids to Strigolactones, Kun-Peng Jia et al., 2017)

Фітоенсинтаза (PSY) опосередковує перший етап каротиногенезу, каталізуючи конденсацію двох молекул геранілгеранілдіфосфату (GGPP; C20) у продукт C40, 15-цис-фітоен. Фітоендесатураза (PDS) вводить два подвійні зв'язки в положенні C11 та C11', що одночасно супроводжується транс- до цис-ізомеризацією сусідніх подвійних зв'язків в положенні C9 та C9'. Ці реакції призводять до 9,15,9'-три-цис- ζ -каротину через 9,15-цис-фітофлуен. ζ -каротин-ізомераза (Z-ISO) перетворює 9,15,9'-три-цис- ζ -каротин на 9,9'-ди-цис- ζ -каротин, субстрат ζ -каротин-десатурази (ZDS), яка вводить два подвійні зв'язки в положенні C7 та C7', збільшуючи кількість спряжених подвійних зв'язків до 11 та утворюючи 7,7',9,9'-тетра-цис-лікопен

(пролікопен). Каротин-ізомераза (Crt-ISO) каталізує ізомеризацію чотирьох цис-подвійних зв'язків у пролікопені, що призводить до утворення повністю транс-лікопену. Лікопен- β -циклаза (LCY- β) вводить два β -іононові кільця в повністю транс-лікопен, що призводить до утворення повністю транс- β -каротину. Для утворення α -каротину потрібні LCY- β та лікопен- ϵ -циклаза (LCY- ϵ), які вводять відповідно β - та ϵ -іононове кільце. Різні гідроксилази (HYD) перетворюють циклічні каротини α -каротин та β -каротин відповідно на повністю транс-лютеїн та повністю транс-зеаксантин. Повністю трансзеаксантин може бути оборотно епоксидований у повністю транс-віолаксантин. Епоксидування та деепоксидування каталізуються зеаксантин епоксидазою (ZEP) та віолаксантин деепоксидазою (VDE) відповідно. Неоксантинсинтаза (NSY) виробляє кінцевий продукт β -гілки, повністю транс-неоксантин, з повністю трансвіолаксантину.

Також пропонується альтернативний підхід, використовуючи гени лікопен ϵ -циклази з салату (*Lactuca sativa*), або гени з інших рослин (наприклад, *Adonis aestivalis*) [33, 34]. Незалежно від джерела гена, ключовим є його експресія в мікроорганізмах, які або природно продукують каротиноїди (β -каротин, зеаксантин, лікопен), або сконструйовані для синтезу каротиноїдів шляхом введення додаткових ферментів, таких як геранілгераніл пірофосфат синтаза, фітоен синтаза та фітоен дегідрогеназа [41].

Через біосинтез разом з лютеїном в клітинах зеаксантину (рис. 1.2), досліджено шляхи регуляції співвідношення зеаксантину до лютеїну за допомогою індукцйбельних промоторів (наприклад, *lac* або тетрациклінової системи) [33, 34]. Це дозволяє оптимізувати вихід лютеїну в мікроорганізмах, що продукують зеаксантин, шляхом контролю експресії лікопен ϵ -циклази та лікопен β -циклази. Альтернативно пропонується використання інгібіторів лікопен циклази (наприклад, 2-(4-хлорофенілтіо)триетиламіну) для точного регулювання [28, 34].

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		10

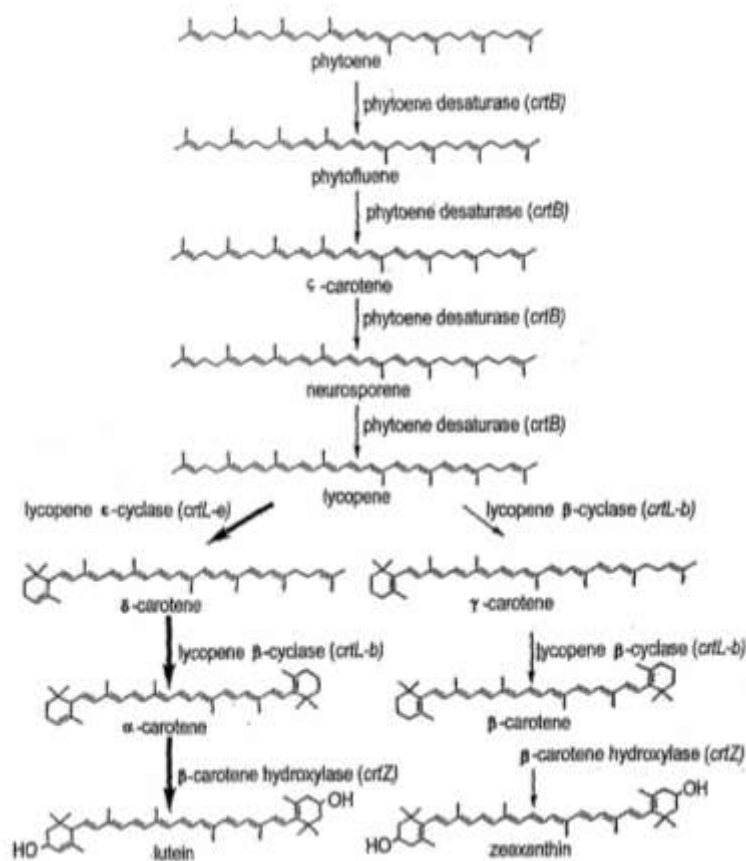


Рис. 1.1 - Біосинтетичний шлях виробництва лютеїну та зеаксантину в клітинах мікроорганізмів [34]

1.2 Технологічні аспекти виробництва лютеїну мікробним синтезом

Отримання генно-модифікованого мікроорганізму, здатного до надсинтезу лютеїну, складається із традиційних етапів технології рекомбінантної ДНК: отримання гена-вставки, вбудування його у підходящий вектор, трансформація організму-хазяїна та вирощування організму з експресією цільового білка. Ген-вставка - ізольований поліпептид лікопенової ϵ -циклази - може бути отриманий, наприклад, шляхом екстракції з природного джерела (наприклад, клітини рослини), хімічного синтезу або шляхом виробництва в хазяїні. Наприклад, поліпептид лікопенової ϵ -циклази може бути вироблений шляхом лігування молекули нуклеїнової кислоти, що кодує

поліпептид, у нуклеїнову кислотну конструкцію, таку як експресійний вектор, та трансформації бактеріальної або еукаріотичної клітини-хазяїна цим експресійним вектором. Загалом, нуклеїнові конструкції включають елементи контролю експресії, операбельно пов'язані з нуклеїновою кислотною послідовністю, що кодує поліпептид лікопенової ϵ -циклази. Елементи контролю експресії зазвичай не кодують генний продукт, а натомість впливають на експресію нуклеїнової кислотної послідовності. Елементи контролю експресії можуть включати, наприклад, промоторні послідовності, енхансерні послідовності, елементи відповіді, сайти поліаденілювання або індуковані елементи [32-34].

Як бактеріальні системи експресії можна використовувати штам *E. coli*, такий як BL-21. Підходящі вектори *E. coli* включають, але не обмежуються ними, серію векторів pGEX, що виробляють злиті білки з глутатіон S-трансферазою (GST). Трансформовані *E. coli* зазвичай ростуть експоненційно, потім стимулюються ізопропілтіогалактопіранозидом (IPTG) перед збиранням. Загалом, такі злиті білки розчинні і можуть бути легко очищені з лізованих клітин шляхом адсорбції на глутатіон-агарозних намистинах з подальшою елюцією в присутності вільного глутатіону. Вектори pGEX розроблені для включення сайтів розщеплення тромбіном або протеазою фактора Ха, так що клонований цільовий генний продукт може бути вивільнений з GST-фрагмента [21, 25, 32].

В еукаріотичних клітинах-хазяїнах може бути використано ряд вірусних експресійних систем для експресії поліпептидів лікопенової ϵ -циклази. Нуклеїнова кислота, що кодує поліпептид лікопенової ϵ -циклази, може бути клонована, наприклад, у бакуловірусний вектор, такий як pBlueBac (Invitrogen), а потім використана для ко-трансфекції клітин комах, таких як клітини *Spodoptera frugiperda* (Sf9), з ДНК дикого типу з *Autographa californica* multiply enveloped nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV). Рекомбінантні віруси, що виробляють поліпептиди лікопенової ϵ -циклази, можуть бути

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		12

ідентифіковані стандартною методологією. Альтернативно, нуклеїнова кислота, що кодує поліпептид лікопенової ϵ -циклази, може бути введена у вірусний вектор на основі SV40, ретровірусу або вірусу віспи, і використана для інфікування відповідних клітин-хазяїв. Після трансформації клітина-хазяїн експресує цільову речовину [26, 35].

Надалі процес виробництва лютеїну мікробним синтезом на основі генно-модифікованого організму включає стандартні для мікробного синтезу стадії:

Культивування: Мікроорганізми вирощують за принципом масштабування у інокуляторах та ферментерах на середовищах з глюкозою або ксилозою як джерелом вуглецю. Після досягнення потрібної біомаси можливе додавання індукторів (наприклад, IPTG, арабінозу) для активації експресії генів [18, 20, 30].

Екстракція: Лютеїн екстрагують органічними розчинниками (ацетон, гексан) і аналізують за допомогою ВРХ або спектрофотометрії (максимум поглинання лютеїну в ацетоні - 451 нм). Лютеїн можна екстрагувати органічним розчинником, таким як ацетон, і виявити за допомогою сканування поглинання від 400 до 500 нм у тому ж органічному розчиннику. У деяких випадках бажано провести зворотну екстракцію другим органічним розчинником, таким як гексан. Максимальне поглинання лютеїну залежить від розчинника, в якому він знаходиться. Наприклад, в ацетоні максимальне поглинання лютеїну становить 451 нм, тоді як максимальне поглинання зеаксантину становить 454 нм. У гексані максимальне поглинання лютеїну та зеаксантину становить 446 нм та 450 нм відповідно [34]. Для виявлення лютеїну також можна використовувати вискоєфективну рідинну хроматографію в поєднанні з мас-спектрометрією [33].

Формулювання: Біомасу висушують для створення кормових добавок або лютеїн очищають для використання у виробництві харчових продуктів. Додають антиоксиданти (етоксихін, ВНА) та олії (кукурудзяна, соєва) для

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		13

стабільності.

1.3 Обґрунтування мікроорганізму для виробництва лютеїну та перспективності реалізації технології на вітчизняному підприємстві

На основі аналізу існуючих технологій виробництва лютеїну складено табл. 1.1 з перевагами та недоліками основних продуцентів лютеїну [27, 32-34].

Таблиця 1.1

Характеристика мікроорганізмів – продуцентів лютеїну

Мікроорганізм	Переваги	Недоліки
<i>Escherichia coli</i>	Легкість генетичної маніпуляції, швидке зростання	Потреба у введенні повного біосинтезу
<i>Pantoea stewartii</i>	Природне продукування зеаксантину, менше модифікацій	Потенційна патогенність (фітопатогенна бактерія)
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Високе накопичення каротиноїдів, фотосинтез	Складніші вимоги до культивування
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Природне продукування каротиноїдів	Низький вихід лютеїну, складна культивування

Для використання пропонуємо бактерію *Pantoea stewartii*, яка є перспективним мікроорганізмом для виробництва лютеїну на вітчизняному підприємстві з таких причин [33, 34]:

1. Природне продукування зеаксантину. *P. stewartii* вже має частину біосинтетичного шляху каротиноїдів, що зменшує кількість необхідних генетичних модифікацій порівняно з *E. coli*.

2. Експериментальна підтвердженість. Виробництво лютеїну на основі цього продуцента відпрацьовано, дослідження демонструють успішне виробництво лютеїну в *P. stewartii* після введення гена лікопен ϵ -циклази, з

високими піками на хроматограмах.

3. Простота культивування. На відміну від *Rhodobacter*, що потребує фотосинтетичних умов, *P. stewartii* легко культивується в стандартних ферментерах.

4. Економічна доцільність. Через природну здатність продукувати пігмент, потрібна менша кількість модифікацій, а доступність сировини (глюкози) знижують собівартість.

Хоча *P. stewartii* має потенційну патогенність, сучасні методи біобезпеки (стерилізація, контроль біомаси) дозволяють мінімізувати ці ризики.

Для організації виробництва лютеїну на вітчизняному підприємстві необхідно врахувати вітчизняну технологічну базу, доступність сировини, регуляцію виробництва у зв'язку із використанням рекомбінантних штамів, характеристику ринку.

Українські біотехнологічні підприємства (наприклад, у фармацевтичній чи аграрній сфері) мають досвід ферментації, зокрема фармацевтичні виробники - ТОВ «Біолік-Фарма» (м. Харків), компанія Farmak (м. Київ), виробники ветеринарної продукції – наприклад компанія Віорпарт (м. Харків), EnzimBiotech (м. Ладижин) спеціалізується на препаратах, отриманих мікробним синтезом, для рослинництва, тваринництва, виробництві харчових та технічних ферментів. Але, якщо враховувати необхідність розробки рекомбінантного штаму продуцента лютеїну, то вони можуть потребувати модернізації для здійснення генної інженерії. Хоча також слід відмітити наявність в Україні науково-дослідних установ та підприємств, які мають потужний потенціал та власні нароби у цій сфері та департаменти з розробки біотехнологічної продукції, зокрема відділ розробки біотехнологічної продукції має компанія Юрія Фарм, яка займається повним циклом розробки рекомбінантних білків, моноклональних антитіл, РНК-терапією тощо. Крім цього, слід враховувати можливість придбання генно-модифікованого штаму

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		15

від закордонних наукових центрів та установ, що забезпечить можливість проведення стандартних етапів мікробного синтезу без необхідності застосування технологій рекомбінантної ДНК.

Якщо розглядати потенціал ринку стосовно сировини, то слід відмітити що глюкоза та інші вуглеводи, які будуть використовуватись як джерела карбону у живильних середовищах, доступні в Україні завдяки розвиненій цукровій і крохмальній промисловості. Тому перспективною є налагодження співпраці з місцевими аграрними підприємствами для постачання сировини, наприклад, з ПрАТ «Дніпровський крохмальнопаточний комбінат», ТОВ «Інтерстарч Україна», що спеціалізуються на виробництві меляси, кукурудзяної патоки, крохмалю кукурудзяного, мальтозної патоки, глюкози та інших вуглеводах.

Враховуючи, що використання генетично модифікованих організмів регулюється Законом України «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів», підприємство-виробник повинен буде провести сертифікацію та оцінку безпеки.

При оцінці ринку з точки зору майбутньої реалізації готової продукції, слід відмітити популяризованість каротину на українському ринку, яка зростає через попит на функціональні продукти та кормові добавки для птахівництва.

Таким чином, мікробний синтез лютеїну з використанням *Pantoea stewartii* є перспективним напрямком для біотехнологічної промисловості України, що може забезпечити стабільне виробництво цінного пігменту для внутрішнього та експортного ринків.

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
						16
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

2 ХАРАКТЕРИСТИКА ГОТОВОГО ПРОДУКТУ, СИРОВИНИ, МАТЕРІАЛІВ, НАПІВПРОДУКТІВ

2.1 Характеристика готового продукту

Готовий продукт - сухий порошок лютеїну, отриманий шляхом мікробного синтезу з використанням генетично модифікованого штаму *Pantoea stewartii* з геном лікопен ϵ -циклази. Продукт призначений для постачання як сировина (in-bulk) підприємствам харчової, фармацевтичної, сільськогосподарської та косметичної промисловості. Лютеїн є цінним каротиноїдом завдяки своїм антиоксидантним властивостям, здатності надавати природний колір і підтримувати здоров'я очей.

Склад продукту. Сухий порошок лютеїну складається з таких компонентів:

Лютеїн ($C_{40}H_{56}O_2$): Основна активна речовина, ксантофільний каротиноїд, синтезований мікробним шляхом. Концентрація варіюється залежно від призначення: 5–20% для кормових добавок, що є стандартним для птахівництва; 20–80% для харчових і фармацевтичних продуктів, де потрібна вища чистота.

Носії: Для полегшення обробки та підвищення стабільності додаються мальтодекстрин, крохмаль або сахароза (10–20% маси). Мікроінкапсуляція може застосовуватися для захисту від деградації та покращення розчинності у водних системах.

Антиоксиданти: Токоферол, аскорбіл пальмітат або бутильований гідроксианізол (ВНА) додаються для запобігання окисленню.

Склад адаптується до вимог кінцевого споживача, що забезпечує гнучкість для різних галузей.

Фізико-хімічні властивості. Лютеїн як сухий порошок має такі

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
						17
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

характеристики:

Хімічна структура: Молекула з 40 атомами вуглецю, що містить кон'юговані подвійні зв'язки та гідроксильні групи на кінцевих кільцях. Молекулярна маса - 568,87 г/моль.

Колір: Темно-оранжево-червоний у високих концентраціях, що переходить у яскраво-жовтий при розведенні.

Розчинність: Ліпофільний, нерозчинний у воді, але добре розчиняється в органічних розчинниках, таких як ацетон, гексан або хлороформ. Для водних систем потрібна мікроінкапсуляція.

Стабільність: Чутливий до світла, тепла (температура плавлення $\sim 190^{\circ}\text{C}$), кисню та кислот, що може призводити до деградації полієнового ланцюга. Антиоксиданти та мікроінкапсуляція підвищують стабільність.

Оптичні властивості: Максимум поглинання в ацетоні - 445–451 нм, що відповідає жовтому діапазону видимого спектру.

Гранулометричний склад: Розмір частинок залежить від методу сушки (спрей-сушка або ліофілізація) і зазвичай становить 10–500 мкм, що забезпечує хорошу текучість для промислового використання.

Густина насипна: 0,5–0,7 г/см³, залежно від носія та ступеня мікроінкапсуляції.

Ці властивості роблять порошок придатним для використання як сировини, але вимагають ретельного контролю умов обробки.

Органолептичні властивості. Колір: Яскраво-жовтий до оранжево-червоного, залежно від концентрації та носія. Це основна органолептична характеристика, що робить лютеїн цінним як природний барвник.

Смак: Нейтральний, що дозволяє використовувати порошок без впливу на смакові характеристики кінцевих продуктів.

Запах: Відсутній або слабкий, що забезпечує універсальність для харчових і косметичних застосувань.

Нейтральні смак і запах роблять лютеїн ідеальним для широкого спектру

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		18

продуктів, від напоїв до дієтичних добавок.

Пакування. Для постачання in-bulk порошок лютеїну пакується з урахуванням його чутливості до зовнішніх факторів:

Матеріали: Використовуються герметичні, непрозорі бочки (наприклад, пластикові або металеві з поліетиленовим вкладишем) або багат шарові фольговані мішки з низькою проникністю для кисню та вологи.

Захист від окислення: Пакування проводиться під інертним газом (азот) для запобігання деградації.

Об'єм: Для промислових потреб пакування здійснюється в контейнери об'ємом 25–100 кг, що відповідає стандартам постачання сировини.

Маркування: Включає інформацію про склад, концентрацію лютеїну, термін придатності, умови зберігання та відповідність стандартам безпеки.

Зберігання. Для забезпечення стабільності порошку лютеїну необхідні такі умови:

Температура: Оптимальна температура зберігання - 4°C, що забезпечує стабільність до 36 місяців. Для тривалого зберігання рекомендується -20°C для збереження органолептичних і хімічних властивостей.

Світло: Зберігання в темряві або в непрозорій тарі для запобігання фотодеградації.

Вологість: Контроль вологості (менше 10%) для уникнення злежування та деградації.

Кисень: Герметичне пакування з азотним заповненням мінімізує окислення.

Використання. Сухий порошок лютеїну призначений для використання як сировина в різних галузях:

Харчова промисловість: Як природний барвник (E161b) для надання продуктам (маргарин, соуси, напої, десерти) яскравого жовтого кольору. Також використовується для збагачення функціональних продуктів.

Фармацевтична промисловість: У складі дієтичних добавок для

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		19

профілактики вікової макулярної дегенерації, катаракти та інших захворювань, пов'язаних з окислювальним стресом.

Сільськогосподарська промисловість: Як кормова добавка для покращення забарвлення яєць і шкіри птиці, що є важливим для птахівничої галузі України.

Косметична промисловість: У кремах і лосьйонах для захисту шкіри від ультрафіолетового випромінювання та зменшення окислювального стресу.

Функціональні властивості. Лютеїн виконує кілька ключових функцій:

Антиоксидантна дія: Нейтралізує реактивні форми кисню (ROS), захищаючи клітини від окислювального стресу.

Захист очей: Накопичується в макулі сітківки, діючи як світлофільтр і знижуючи ризик очних захворювань.

Забарвлення: Надає природний жовтий колір продуктам і кормам, підвищуючи їхню привабливість.

Функціональне харчування: Збагачує продукти біологічно активними речовинами, сприяючи здоров'ю споживачів.

У табл. 2.1 зібрані основні характеристики готового продукту.

Таблиця 2.1

Характеристика готового продукту – сухого порошку лютеїну

Параметр	Опис
Склад	Лютеїн (5–80%), мальтодекстрин, антиоксиданти (токоферол, ВНА)
Колір	Темно-оранжево-червоний до яскраво-жовтого
Розчинність	Ліпофільний, розчинний в ацетоні, гексані; нерозчинний у воді
Стабільність	Чутливий до світла, тепла, кисню; стабільний при 4°C до 36 місяців
Гранулометричний склад	10–500 мкм, залежно від наповнювачів
Густина насипна	0,5–0,7 г/см ³ , залежно від наповнювачів
Пакування	Непрозорі бочки/мішки, азотне заповнення, 25–100 кг
Зберігання	4°C (до 36 місяців), -20°C для тривалого зберігання
Застосування	Харчові барвники, нутрицевтики, кормові добавки, косметика

2.2 Характеристика сировини

Економічне живильне середовище для культивування *Pantoea stewartii* з геном лікопен ϵ -циклази є ключовим елементом для зниження собівартості виробництва лютеїну на українських підприємствах. *Pantoea stewartii* здатна ефективно рости на середовищах з простими джерелами вуглецю (глюкоза, сахароза) та азоту (аміак, пептони), що дозволяє використовувати побічні продукти агропромисловості, такі як меляса, кукурудзяний гідролізат і дріжджовий автолізат [2, 22]. Пропоноване середовище оптимізовано для промислового ферментаційного виробництва, враховуючи доступність сировини в Україні та вимоги до синтезу каротиноїдів.

Склад середовища (табл. 2.2) розроблено з урахуванням економічної доцільності, місцевих джерел сировини та метаболічних потреб *Pantoea stewartii*. Воно включає джерела вуглецю, азоту, мінеральні солі та мікроелементи, необхідні для росту та синтезу лютеїну.

Таблиця 2.2

Характеристика компонентів середовища для вирощування *Pantoea stewartii*

Компонент	Концентрація (г/л)	Джерело сировини в Україні	Функція
Меляса (сахароза/глюкоза)	30	ПрАТ «Дніпровський крохмальнопаточний комбінат», ТОВ «Інтерстарч Україна»	Джерело вуглецю
Кукурудзяний гідролізат	5	ТОВ «Інтерстарч Україна»	Додаткове джерело вуглецю та мікроелементів
Дріжджовий автолізат	5	ТОВ «Ензим» (Ладизин), місцеві пивоварні	Джерело азоту, вітамінів, амінокислот
(NH ₄) ₂ SO ₄ (сульфат амонію)	2	БАТ «Рівнеазот»	Джерело неорганічного азоту
KH ₂ PO ₄	1,5	Компанія «Пром-Агро»	Джерело фосфору,

(монокалію фосфат)			буферна система
Na_2HPO_4 (динатрію фосфат)	1,0	Компанія «АТК-Україна»	Буферна система
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (сульфат магнію)	0,5	Компанія «САНАГРО УКРАЇНА»	Джерело магнію, кофактор ферментів
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (сульфат заліза)	0,01	ПАТ «Суміхімпром»	Джерело заліза, кофактор синтезу каротиноїдів
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (хлорид кальцію)	0,02	ПАТ «Суміхімпром»	Джерело кальцію, стабілізація мембран

Обґрунтування компонентів. Меляса: Меляса, побічний продукт цукрової промисловості, містить близько 50% сахарози та глюкози, які є ефективними джерелами вуглецю для *Pantoea stewartii*. Доступна в Україні від великих постачальників, таких як ПрАТ «Дніпровський крохмальнопаточний комбінат». Вартість меляси значно дешевше за чисту глюкозу. Перед використанням меляси обробляється (розведення водою, центрифугування для видалення домішок) для забезпечення стерильності та зниження в'язкості.

Кукурудзяний гідролізат: Побічний продукт крохмальної промисловості, багатий на глюкозу, мальтозу та мікроелементи. Доступний від ТОВ «Інтерстарч Україна». Покращує ріст і синтез каротиноїдів завдяки додатковим поживним речовинам.

Дріжджовий автолізат: Джерело органічного азоту, амінокислот, вітамінів групи В і пептидів, що стимулюють ріст *Pantoea stewartii*. Виробляється місцевими підприємствами, або може бути отриманий з відходів пивоваріння, що знижує витрати.

Сульфат амонію: Недороге джерело неорганічного азоту, доступне від хімічних підприємств, таких як ВАТ «Рівнеазот». Підтримує метаболізм бактерій і знижує залежність від дорогих органічних джерел азоту.

Фосфати (KH_2PO_4 , Na_2HPO_4): Забезпечують фосфор для синтезу нуклеїнових кислот і АТФ, а також діють як буферна система для підтримки

pH 6,5–7,0, оптимального для *Pantoea stewartii*.

Мікроелементи (MgSO_4 , FeSO_4 , CaCl_2): Магній, залізо та кальцій є кофакторами ферментів, залучених у синтез каротиноїдів і клітинний метаболізм. Залізо зокрема сприяє синтезу лютеїну.

Умови підготовки середовища. Стерилізація: Середовище автоклавується при 121°C протягом 15–20 хвилин для знищення контамінантів. М'ясу та кукурудзяний гідролізат попередньо фільтрують для видалення твердих часток.

pH: Початкове значення pH встановлюється на 6,8 за допомогою NaOH або HCl.

Розчинення: Компоненти змішуються у воді (дистильованій або деіонізованій) у промислових резервуарах з перемішуванням.

Усі компоненти доступні від українських постачальників, що знижує логістичні витрати та залежність від імпорту.

У разі обмеженої доступності м'яса можна використовувати глюкозний сироп або гідролізати пшеничного крохмалю від місцевих виробників. Перед використанням м'яса та гідролізат аналізуються на вміст цукрів і домішок.

Переваги запропонованого середовища: використання побічних продуктів знижує витрати на сировину в 3–5 разів порівняно з комерційними середовищами; усі компоненти доступні від українських виробників, що підтримує економіку та зменшує залежність від імпорту; середовище забезпечує достатній ріст і синтез лютеїну, порівнянний з лабораторними середовищами (LB); склад легко адаптується до промислових біореакторів (100–5000 л). Впровадження середовища на промисловому рівні потребує пілотного тестування, але має значний потенціал для зниження собівартості виробництва лютеїну.

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		23

2.3 Характеристика біологічного об'єкту

Pantoea stewartii subsp. *stewartii* є перспективним продуцентом лютеїну завдяки природному синтезу каротиноїдів, таких як зеаксантин, і відносно простій генетичній модифікації для введення гена лікопен ε -циклази.

Pantoea stewartii subsp. *stewartii* (раніше *Erwinia stewartii*) (рис. 2.1):

Таксономія: *Bacteria*; *Gamma*proteobacteria; родина *Enterobacteriaceae*; рід *Pantoea*; вид *stewartii*.

Мікробіологічні властивості: грамнегативні, рухливі, жовто пігментовані, мукоїдні, факультативні анаероби, колонії на агарі King's - лимонно-жовтого кольору, круглі, припідняті та опуклі (рис. 2.2) [36].

У табл. 2.3 наведені фенотипічні характеристики *P. stewartii* subsp. *stewartii*.

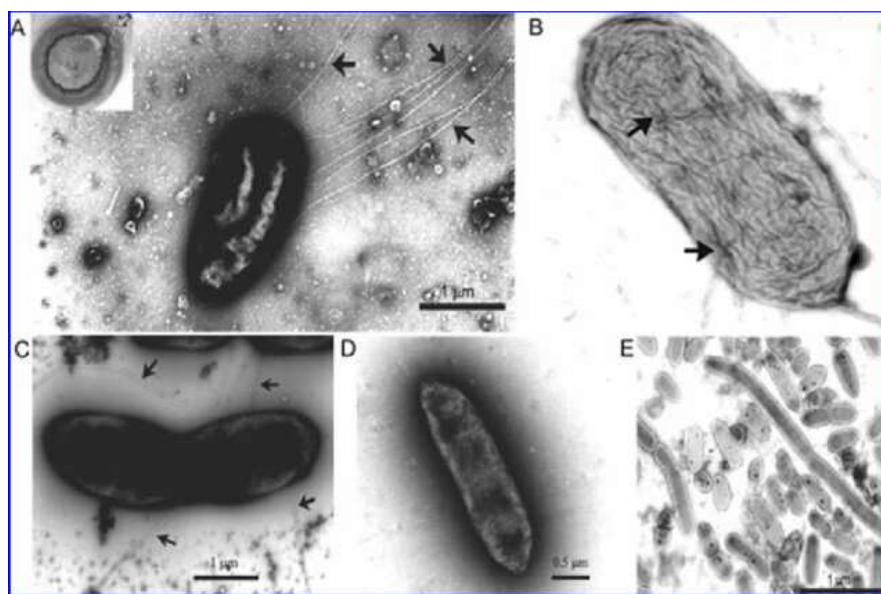


Рис. 2.1 – Клітини *Pantoea stewartii*

(Джерело: *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* Exhibits Surface Motility, Which is a Critical Aspect of Stewart's Wilt Disease Development on Maize, Herrera C. M. et al., 2008)

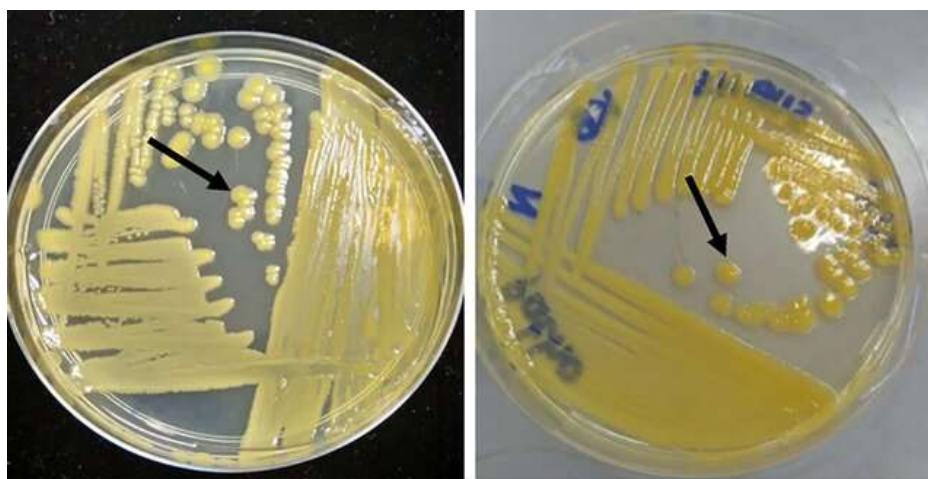


Рис. 2.2 - Морфологія колонії *Pantoea stewartii stewartii* на агаровому середовищі King's

(Джерело: Genetic diversity of *Pantoea stewartii* subspecies *stewartii* causing jackfruit-bronzing disease in Malaysia, Abidin N. et al., 2020)

Таблиця 2.3

Фенотипічні характеристики *P. stewartii subsp. stewartii* [17]

Показник	Характеристика
Фарбування за Грамом	Грамнегативні, короткі прямі палички (0,4–0,7 × 0,9–1,7 мкм)
Оксидазна проба Ковача	(-) Без зміни кольору
Фарбування капсул	(-) Некапсульований
Фарбування ендоспор	(-) Неендоспороутворювачі
Гідроліз Tween80	(-) Немає непрозорих ореолів
Виробництво ацетоїну та індолу	(-) Немає виробництва
Редукція нітратів	(-) Без зменшення
Ріст на цис-аконітаті	(-) Немає росту
Кислотоутворення вуглеводів	(-) Мальтоза, арбутин, саліцин (+) Глюкоза, галактоза, фруктоза та сахароза, рафіноза
Каталазна реакція	(+) Утворюють бульбашки
Потреба в кисні	(+) Факультативний анаероб
Гідроліз крохмалю	(+) Гідролізує крохмаль
Розрідження желатину	(+) Гідролізує желатин

Отримання рекомбінантного штаму *Pantoea stewartii* здійснюється традиційною схемою технології рДНК: ген лікопен ϵ -циклази, ізольований зі шпинату (*Spinacia oleracea*) або інших джерел (наприклад, *Lactuca sativa*), клонується у плазмідний вектор, такий як pKK223-3 або pBS, який містить

промотор для експресії в бактеріях; трансформація проводиться методом електропорації (з параметрами: 25 кВ/см, 200 Ом, 25 мкФ); трансформанти відбираються за маркерними генами (наприклад, резистентність до канаміцину) та перевіряються на продукцію лютеїну за допомогою ВРХ (високоєфективної рідинної хроматографії), де лютеїн виявляється при елюції приблизно за 6,62 хв [33, 34].

Pantoea stewartii є фітопатогеном, що викликає бактеріальне в'янення кукурудзи, тобто ця бактерія містить гени патогенності, що обумовлює необхідність забезпечення біобезпеки.

Бактерія є збудником в'янення Стюарта (бактеріальний вільт) цукрової кукурудзи. Випадки в'янення Стюарта кукурудзи були зареєстровані в усьому світі внаслідок рідкісної передачі через насіння, але в природі вони зустрічаються лише в Північній Америці. Хвороба є ендемічною для США і вперше була зареєстрована у 1897 р. В'янення Стюарта завдало серйозних збитків кукурудзяній промисловості у 1930-х рр., але значення цієї хвороби зменшилося в США завдяки використанню стійких гібридів кукурудзи. Однак в'янення Стюарта залишається проблемою там, де вирощуються сприйнятливі сорти цукрової кукурудзи [36].

В Україні це захворювання було вперше виявлено у 2016 році в таких областях: Львівській, Рівненській, Івано-Франківській, Волинській, Тернопільській та Чернігівській. Згідно з Головним управлінням Держпродспоживслужби бактеріальний вільт кукурудзи, що викликана *Pantoea stewartii*, відноситься до списку А-1 «Карантинні організми відсутні в Україні» [7].

Бактеріальні хвороби зернових культур завдають шкоди, спричиняючи появу плям на різних частинах рослин, що знижує їхню асиміляційну здатність. Також можливе відмирання окремих органів або всієї рослини, зменшення загальної кількості та довжини колосків, зменшення кількості зерен у колосі, а також формування щуплого зерна [7, 17].

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		26

Pantoea stewartii subsp. stewartii переноситься кукурудзяними комахами – стебловими блішками (*Chaetocnema pulicaria*), в їхньому кишківнику ця бактерія живе та перезимовує [7].

Для забезпечення безпечності використання рекомбінантних бактерій, що містять гени патогенності, використовують різноманітні прийоми. Перед застосуванням методів модифікації необхідно ідентифікувати ключові гени патогенності. Одними з ключових чинників вірулентності *Pantoea stewartii* є система секреції III типу, що кодується генами *hrp*, і ефекторний білок *WtsE*, які відіграють важливу роль як у фазі інфікування апопласту, так і під час ураження ксилеми. До критично важливих елементів належить фермент, який руйнує клітинну стінку рослин (CWDE) - він забезпечує поширення бактерії в межах рослини та доступ до поживних речовин. Ще одним визначним чинником є екзополісахаридна капсула (EPS), яку *P. stewartii* продукує в ксилемі; вона не лише захищає бактерії, а й сприяє формуванню біоплівки і потрібна для прояву симптомів в'янення у заражених рослин [36, 39].

Серед інших відомих компонентів вірулентності можна відзначити пігмент капсули, рухливість по поверхні, білки адгезії, виробництво сидерофорів, токсин RTX, системи детоксикації оксидативного стресу (*OxyR* та *SoxR*), порини зовнішньої мембрани, а також *Lon*-протеазу. Процес переходу бактерії з апопласту до ксилеми контролюється переважно за допомогою кворум-сенсорної системи (QS), де сигнали при високій клітинній щільності спричиняють зменшення рухливості бактерій і посилення синтезу капсули [36].

На ранньому етапі інфекції бактерія оселяється як у міжклітинних просторах листової тканини, викликаючи водянисті ураження, так і в ксилемі, що забезпечує її подальше поширення й розвиток в'янення. Основне місце колонізації - це ксилема, де бактерії інтенсивно розмножуються. Після проникнення в ксилему клітини досягають високої щільності та утворюють щільні біоплівки, захищені екзополісахаридною капсулою та слизом [36].

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		27

Такі ущільнені біоплівки разом з EPS блокують водопровідну функцію ксилеми, що зрештою спричиняє в'янення і загибель рослини. Коли мембрани в ксилемних ямках закупорюються, екзополісахарид розширюється та розриває їх, що дозволяє бактеріям переміщуватись до сусідніх судин або крізь стінки до нових ділянок тканин. Таким чином, EPS необхідний для повсюдного поширення патогена в рослині та забезпечення його повної вірулентності [17].

Розглянемо основні методи боротьби з генами патогенності, які можуть застосовуватись у цьому випадку [21, 23, 24, 26-28, 31-34, 41].

1. Біоінформатичний аналіз для ідентифікації генів патогенності. Аналіз геному *Pantoea stewartii* (наприклад, штам RON18713, GenBank) за допомогою біоінформатичних інструментів, таких як BLAST, RAST або PathogenFinder, для ідентифікації генів, пов'язаних з патогенністю. Порівняння з геномами непатогенних штамів *Pantoea* (наприклад, *P. agglomerans*) для виявлення унікальних патогенних локусів. Можливе застосування для виявлення цільових генів (зокрема для бактерії - *tox*, *hrp/hrc*, *cps*) для подальшого нокауту; створення бази даних для планування генетичних модифікацій.

2. Гомологічна рекомбінація для нокауту генів. Використання гомологічної рекомбінації для заміни або видалення генів патогенності шляхом введення плазмиди з фланкуючими послідовностями цільового гена та маркерним геном. Наприклад, гени *hrp/hrc* або *tox* можуть бути видалені шляхом введення плазмиди pKNG101, що містить фланки гена та ген *sacB* для контроселекції.

Може бути реалізована за наступною процедурою: конструювання плазмиди з фланками (500–1000 п.н.) цільового гена, трансформація *Pantoea stewartii* методом електропорації (25 кВ/см, 200 Ом, 25 мкФ), відбір мутантів за маркерним геном і втратою *sacB* (селекція на сахарозі), підтвердження нокауту за допомогою ПЛР і секвенування.

Можливе застосування для: видалення генів *tox* для зниження

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		28

токсичності, нокаут *cps/wsc* для запобігання формуванню біоплівки.

3. Редагування геному за допомогою CRISPR-Cas. Використання системи CRISPR-Cas9 для точного редагування генів патогенності шляхом введення подвійних розривів ДНК і гомологічної репарації. Наприклад, ген *esaR* (регулятор кворум-сенсингу) може бути інактивований шляхом введення мутацій у його кодуєчу ділянку.

Може бути реалізована за наступною процедурою: дизайн sgRNA (специфічної РНК) для цільового гена за допомогою програм, таких як CRISPRdesign, конструювання плазмиди, що експресує Cas9 і sgRNA (наприклад, pCas9), введення шаблону ДНК для гомологічної репарації (з делецією або мутацією), трансформація *Pantoea stewartii* електропорацією, відбір мутантів і підтвердження редагування секвенуванням.

Можливе застосування для: інактивації *esaR* для порушення регуляції патогенності, видалення *hrp/hrc* для блокування системи секреції.

4. Хімічний або УФ-мутагенез з подальшим скринінгом. Викликання випадкових мутацій за допомогою хімічних мутагенів (етилметансульфонат), УФ-випромінювання або транспозонів з подальшим скринінгом на втрату патогенності. Мутанти тестуються на здатність викликати в'янення кукурудзи в лабораторних умовах.

Може бути реалізована за наступною процедурою: обробка клітин *Pantoea stewartii* УФ-випромінюванням (254 нм, доза 10–50 Дж/м²) або EMS (0,1–1% розчин); культивування мутантів на агарі для відбору виживаючих колоній; тестування мутантів на патогенність (інокуляція кукурудзи, оцінка симптомів), аналіз геному мутантів для ідентифікації змін у генах патогенності.

Можливе застосування для: інактивації *fli/flh* для зниження рухливості, втрати *cps* для зменшення адгезії.

5. Біологічний ізоляційний дизайн. Введення генетичних модифікацій, що запобігають виживанню штаму поза контрольованими умовами

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		29

(наприклад, ауксотрофія або синтетична летальність). Наприклад, нокаут генів біосинтезу амінокислот (*leuB*, *ilvC*) з додаванням відповідних амінокислот у середовище.

Може бути реалізована за наступною процедурою: ідентифікація генів, необхідних для виживання в природі (наприклад, *leuB*), нокаут генів за допомогою CRISPR-Cas або гомологічної рекомбінації, культивування штаму в середовищі з додаванням лейцину або ізoleyцину. Це забезпечить обмеження виживання штаму в природі, зниження ризику поширення.

6. Контроль регуляторних систем. Інактивація глобальних регуляторів, таких як *esaR* або *lrp*, які контролюють експресію багатьох генів патогенності. Наприклад, мутація в *esaR* блокує кворум-сенсинг, що знижує продукцію біоплівки і токсинів.

Може бути реалізована за наступною процедурою: використання CRISPR-Cas для введення точкових мутацій у *esaR*, перевірка фенотипу (зниження адгезії, втрата патогенності).

Застосовується для блокування множинних генів патогенності одним втручанням.

2.4 Біосинтез цільового продукту

Каротиноїди - це клас терпеноїдів, які синтезуються з ізопренових одиниць (C5) - ізопентенілпірофосфату (isopentenyl pyrophosphate, IPP) та його ізомеру диметилалілпірофосфату (dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP). У бактеріях вони відіграють важливу роль як антиоксиданти, пігменти та попередники апокаротиноїдів. У природі існують два незалежних біосинтетичних шляхи для отримання IPP/DMAPP: мевалонатний (mevalonate, MVA) шлях та шлях 2-С-метил-D-еритритол-4-фосфату (2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate, MEP), також відомий як 1-дезоксид-ксилозу-5-

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		30

фосфат (1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate, DXP) (рис. 2.3 [41]). Більшість бактерій використовують виключно шлях MEP, тоді як більшість еукаріотів та архей мають лише шлях MVA. Рослини мають обидва шляхи: шлях MVA, розташований у цитоплазмі рослин, та шлях MEP, розташований у пластидах.

Розглянемо *етапи загального біосинтезу каротиноїдів* у бактеріях [28, 31, 32, 41].

Утворення IPP та DMAPP. Бактерії переважно використовують MEP шлях для синтезу IPP і DMAPP, що складаються із таких реакцій:

1. Конденсація пірувату та гліцеральдегід-3-фосфату за участі DXP-синтази (dxs) з утворенням 1-дезоксид-ксилозу-5-фосфату (DXP).
2. DXP редукується до MEP ферментом DXP-редуктазою (dxr).
3. MEP перетворюється в 4-дифосфотидил-2-С-метил-D-еритритол (CDPME) ферментом CDPME-синтазою (ispD).
4. CDPME фосфорилується до CDPMEP ферментом CDPME-кіназою (ispE).
5. CDPMEP циклізується до 2-С-метил-D-еритритол-2,4-циклодифосфату (MEC) ферментом MEC-синтазою (ispF).
6. MEC перетворюється в 1-гідрокси-2-метил-2-(Е)-бутеніл-4-дифосфат (HMBPP) ферментом HMBPP-синтазою (ispG).
7. HMBPP редукується до суміші IPP і DMAPP (співвідношення 5–6:1) ферментом HMBPP-редуктазою (ispH).
8. IPP ізомераза (idi) регулює співвідношення IPP:DMAPP за потребами клітини.

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		31

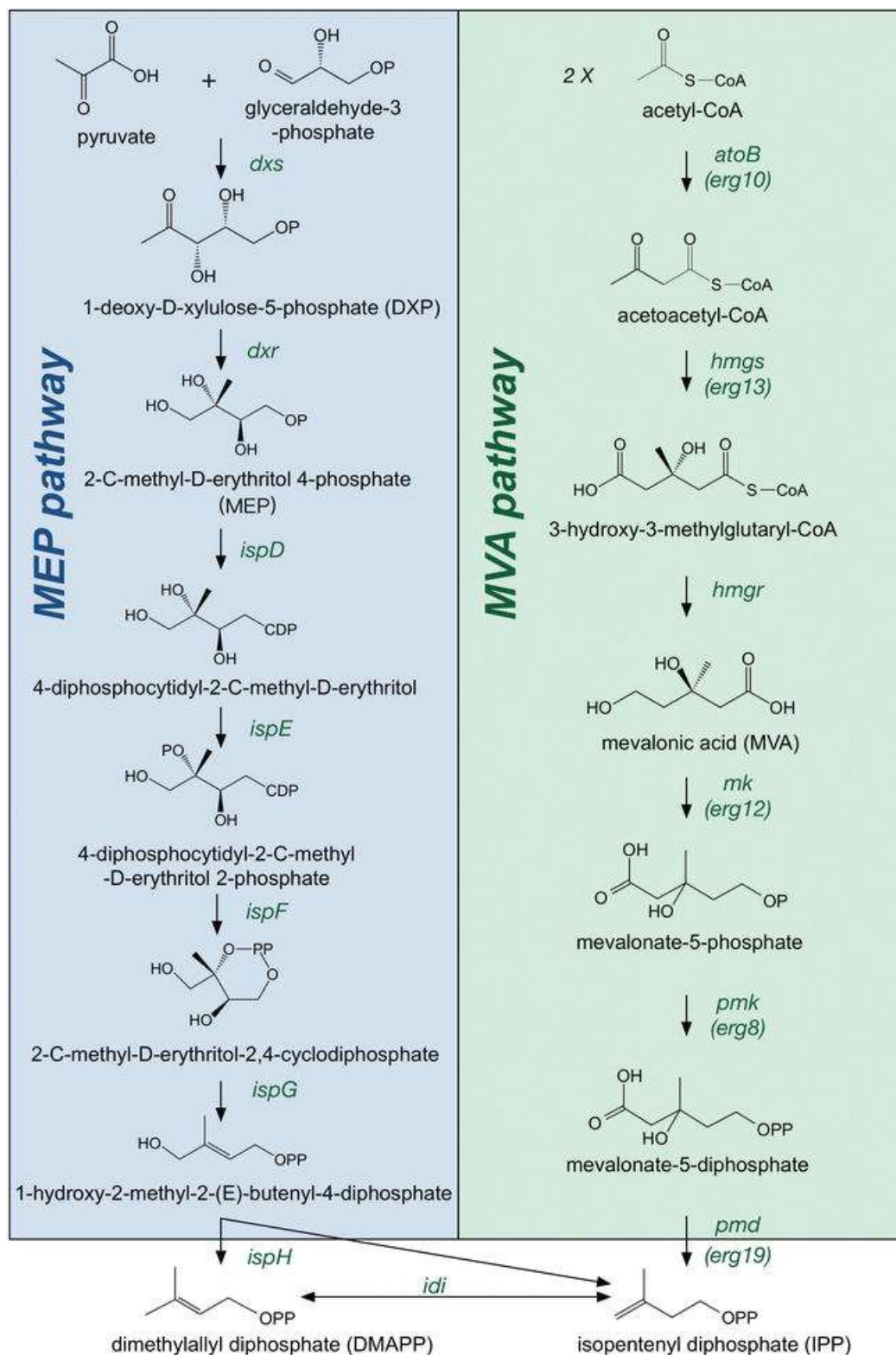


Рис. 2.3 - Біосинтетичний шлях терпеноїдних попередників: шляхи MEP та MVA (пояснення в тексті)

(Джерело: Biosynthesis of Carotenoids and Apocarotenoids by Microorganisms and Their Industrial Potential. From the Edited Volume Progress in Carotenoid Research. Zhang C. 2018)

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

MEP шлях має вищий теоретичний вихід порівняно з MVA шляхом через використання різних кофакторів (ATP, NADPH, CTP), але його практичний вихід обмежується низькою активністю ферментів *ispG* та *ispH*, які потребують залізо-сірчаних кофакторів.

Синтез попередників каротиноїдів. Складається із біосинтезу таких речовин:

1. Геранілпірофосфат (GPP, C₁₀): Утворюється конденсацією IPP і DMAPP за участі GPP-синтази (*gpps*).
2. Фарнезилпірофосфат (FPP, C₁₅): Синтезується додаванням ще однієї молекули IPP до GPP ферментом FPP-синтазою (*fpps*).
3. Геранілгеранілпірофосфат (GGPP, C₂₀): Утворюється додаванням IPP до FPP ферментом GGPP-синтазою (*crtE*).
4. Фітоен (C₄₀): Перший каротиноїд, синтезується конденсацією двох молекул GGPP ферментом фітоен-синтазою (*crtB*). Фітоен є безбарвним з трьома кон'югатами подвійних зв'язків і становить основу для всіх C₄₀ каротиноїдів.

Перетворення фітоену в каротиноїди (рис. 2.4 [41]). Фітоен є попередником двох груп каротиноїдів: каротенів (вуглеводневі, наприклад, лікопен, β-каротин) та ксантофілів (окиснені, наприклад, лютеїн, зеаксантин). Основні етапи:

1. Десатурація: Фітоен десатурується ферментом фітоен-десатуразою (*crtI*), утворюючи лікопен через нейрофлуїн і ζ-каротин. Лікопен має 11 кон'югатів подвійних зв'язків, що надають йому червоного кольору.
2. Циклування: Лікопен β-циклаза (*crtY* або *lycB*) циклізує кінцеві групи лікопену, утворюючи β-каротин з двома β-кільцями. Лікопен ε-циклаза (*crtL* або *lycE*) утворює ε-кільце, що є ключовим для синтезу лютеїну.
3. Окиснення: Гідроксилази (*crtR*, *crtZ*) додають гідроксильні групи, перетворюючи каротени в ксантофіли, такі як зеаксантин або лютеїн.

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		33

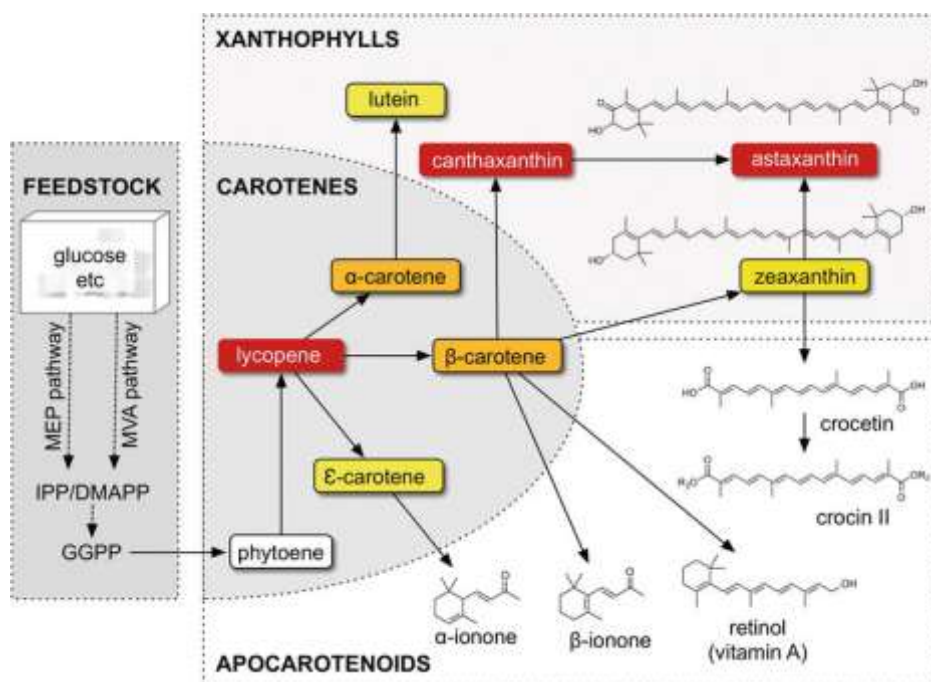


Рис. 2.4 – Утворення каротиноїдів із попередників [41]

Лютеїн ($C_{40}H_{56}O_2$) є ксантофільним каротиноїдом з одним β -кільцем і одним ϵ -кільцем, а також двома гідроксильними групами. У природних умовах бактерії, такі як *Pantoea stewartii*, синтезують зеаксантин через MEP шлях і каротиноїдний біосинтез як описано вище:

1. MEP шлях: Синтез IPP/DMAPP, як описано вище.
2. GGPP і фітоен: Утворення GGPP (crtE) і фітоену (crtB).
3. Лікопен: Десатурація фітоену до лікопену (crtI).
4. β -каротин: Циклування лікопену до β -каротину за допомогою лікопен β -циклази (crtY).
5. Зеаксантин: Гідроксилування β -каротину ферментом β -каротин-гідроксилазою (crtZ), що додає дві гідроксильні групи.

Для синтезу лютеїну в *Pantoea stewartii* вводиться ген лікопен ϵ -циклази (crtL або lycE), зазвичай із рослин, таких як шпинат (*Spinacia oleracea*) або салат (*Lactuca sativa*) [34]. Цей фермент циклізує один кінець лікопену, утворюючи ϵ -кільце, що веде до синтезу α -каротину, а потім лютеїну.

Кроки біосинтезу лютеїну в рекомбінантній *Pantoea stewartii*:

1. Лікопен: Утворюється з фітоєну через crtI.

2. Циклування: Лікопен ϵ -циклаза (crtL) додає ϵ -кільце на один кінець лікопену, утворюючи δ -каротин. Лікопен β -циклаза (crtY) додає β -кільце на другий кінець, утворюючи α -каротин (з одним β - і одним ϵ -кільцем).

3. Гідроксилювання: α -каротин гідроксилюється ферментом β -каротин-гідроксилазою (crtZ), додаючи гідроксильні групи до β - і ϵ -кілець, утворюючи лютеїн.

Згідно з дослідженнями, рекомбінантна *Pantoea stewartii* з геном лікопен ϵ -циклази синтезує 139,5–289,4 мкг лютеїну на грам сухої ваги клітин [34].

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		35

3 ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

3.1 Розрахунок витрат компонентів

3.1.1 Розрахунок виходу біомаси культури та цільового продукту та шляхи їх оптимізації

*Розрахунок теоретичного виходу біомаси *Pantoea stewartii**

Склад запропонованого живильного середовища для *Pantoea stewartii* (г/л):

М'яса: 30 г/л

Кукурудзяний гідролізат: 7,5 г/л.

Дріжджовий автолізат: 6,5 г/л.

(NH₄)₂SO₄: 2,5 г/л.

KH₂PO₄: 1,5 г/л.

Na₂HPO₄: 1,0 г/л.

MgSO₄·7H₂O: 0,5 г/л.

FeSO₄·7H₂O: 0,01 г/л.

CaCl₂·2H₂O: 0,02 г/л.

Джерелами вуглецю є м'яса, кукурудзяний гідролізат, дріжджовий автолізат, джерелами азоту - сульфат амонію, дріжджовий автолізат.

Вміст вуглеводів: м'яса містить близько 50% цукрів (сахароза, глюкоза), кукурудзяний гідролізат містить до 80% глюкози, дріжджовий автолізат - 30% глюкози.

Якщо вважати, що половина глюкози використовується для енергії, інша половина - для синтезу біомаси, то вміст вуглецю в біомасі 50%, вміст азоту в біомасі 10% [9, 13].

Молекулярна маса глюкози (C₆H₁₂O₆) 180 г/моль, з яких вуглець становить 6×12 = 72 г/моль.

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
						36
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Розрахунок теоретичного виходу біомаси за Карбоном:

1. Вміст глюкози в мелясі (меляса 30 г/л, вміст цукрів 50%):

$$30 \times 50 / 100 = 15 \text{ г/л}$$

Вихід вуглецю з глюкози:

$$15 \times 72 / 180 = 6,0 \text{ г/л.}$$

2. Вміст глюкози в кукурудзяному гідролізаті (кукурудзяний гідролізат, 7,5 г/л, вміст глюкози 80%):

$$7,5 \times 80 / 100 = 6,0 \text{ г/л.}$$

Вихід вуглецю:

$$6,0 \times 72 / 180 = 2,4 \text{ г/л.}$$

3. Вміст глюкози в дріжджовому автолізаті (дріжджовий автолізат 6,5 г/л, вміст глюкози 30%):

$$6,5 \times 30 / 100 = 1,95 \text{ г/л.}$$

Вихід вуглецю:

$$1,95 \times 72 / 180 = 0,78 \text{ г/л.}$$

Сумарний вуглець:

$$6,0 + 2,4 + 0,78 = 9,18 \text{ г/л.}$$

Половина вуглецю йде на енергію, половина - на біомасу:

$$9,18 / 2 = 4,59 \text{ г/л.}$$

Але враховуючи вміст вуглецю у біомасі 50%, теоретичний вихід біомаси:

$$4,59 / 0,5 = 9,18 \text{ г/л.}$$

Розрахунок теоретичного виходу біомаси за Нітрогеном:

1. Вміст азоту в $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (сульфат амонію 2,5 г/л):

Молекулярна маса $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$:

$$14 \times 2 + 1 \times 8 + 32 + 16 \times 4 = 132 \text{ г/моль.}$$

Вміст азоту:

$$14 \times 2 / 132 = 0,212 \text{ г/г.}$$

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
						37
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Кількість азоту:

$$2,5 \times 0,212 = 0,53 \text{ г/л.}$$

2. Вміст азоту в дріжджовому автолізаті (містить близько 10% азоту):

Кількість азоту:

$$6,5 \times 0,1 = 0,65 \text{ г/л.}$$

Сумарний азот:

$$0,53 + 0,65 = 1,18 \text{ г/л.}$$

Враховуючи вміст азоту в біомасі 10%, теоретичний вихід:

$$1,18 / 0,1 = 11,8 \text{ г/л.}$$

Теоретичний вихід біомаси (на 1 л)

Таким чином, лімітуючим фактором є вуглець, оскільки він обмежує вихід до меншого значення (теоретичний вихід біомаси - 9,18 г/л).

Теоретичний вихід біомаси (з 1 ферментера)

З урахуванням того, що на ділянці ферментації пропонується встановлення головних ферментерів на 20 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,7 (точний об'єм буде уточнено надалі), розрахуємо вихід біомаси з 1 ферментера:

$$9,18 \text{ г/л} \times 20000 \text{ л} \times 0,7 = 128520 \text{ г} = 128,52 \text{ кг.}$$

Розрахунок теоретичної кількості лютеїну

Для штаму *Pantoea stewartii* з описаною модифікацією максимальна продуктивність 289,4 мкг лютеїну на грам сухої ваги клітин [34].

Враховуючи втрати лютеїну під час екстракції, очистки та сушки (прийmemo на рівні 20 %), кількість лютеїну, отримана з 1 ферментера, складає:

$$128520 \text{ г} \times 0,2894 \text{ мг/г} \times 0,8 = 29755 \text{ мг} = 29,755 \text{ г.}$$

Шляхи оптимізації для збільшення виходу цільового продукту

Враховуючи невеликі кількості отримання цільового продукту, розглянемо генетичні, мікробіологічні та технологічні шляхи оптимізації технології з метою підвищення виходу цільового продукту. Сучасні стратегії,

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		38

які можна застосувати для оптимізації синтезу лютеїну, передбачають моделювання ферментаційних процесів за допомогою кінетичних, стехіометричних та машинно-навчальних моделей. Кожна стратегія спрямована на збільшення біомаси, продуктивності штаму або зменшення втрат лютеїну.

1. Генетичні шляхи оптимізації [21, 24, 32]

Генетична модифікація *Pantoea stewartii* дозволяє підвищити синтез лютеїну шляхом посилення метаболічних шляхів біосинтезу каротиноїдів (МЕР-шлях) та зменшення конкуруючих шляхів. Аналіз застосування різних стратегій для інших штамів показав, що це можливо, наприклад, за рахунок переекспресії генів МЕР-шляху, зокрема (1-деокси-D-ксилулоза-5-фосфат синтаза), *dxr* (1-деокси-D-ксилулоза редуктоізомераза), *idi* (ізопентенілдифосфат ізомераза). Оскільки IPP та DMAPP є попередниками для синтезу ізопреноїдів, збільшення їхнього пулу може покращити накопичення ізопреноїдів. Хоча високий рівень накопичення IPP та DMAPP є важливим для виробництва ізопреноїдів, є дослідження, що він є токсичним і може призвести до значного пригнічення росту. Ця дилема призвела до появи низки стратегій для синтетичних шляхів виробництва ізопреноїдів з «розділенням росту» та «обхідними» шляхами, які включають компоненти шляхів MVA/МЕР, але уникають накопичення IPP/DMAPP [24.].

Іншим варіантом може бути оптимізація генів каротиноїдного шляху (*crtE* (геранілгераніл пірофосфат синтаза), *crtB* (фітон синтаза), *crtI* (фітон десатураза), *crtY* (лікопен β-циклаза), *crtZ* (β-каротин гідроксилаза, наприклад, введення *crtZ* з рослин (*Arabidopsis thaliana*)), в результаті чого можливе посилення синтезу лютеїну за рахунок лікопену.

Перспективною вважається і інактивація конкуруючих шляхів (наприклад, *crtX* (зеаксантин глюкозилтрансфераза) для зменшення синтезу інших каротиноїдів (зокрема, зеаксантина) та перенаправлення потоку до лютеїну. Також можливі стратегії вставки генів під сильний промотор

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		39

(наприклад, T7 або *lac*), CRISPR/Cas9 для точкової інтеграції або плазмідна експресія.

Застосування цих стратегій може забезпечити вихід лютеїну до 400–500 мкг/г. Але враховуючи необхідність залучення додаткових ресурсів на інженерію нового штаму, складність його реалізації, тривалість R&D етапу та суворі вимоги та потребу у сертифікації такого штаму згідно з Законом України «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів», генетичні шляхи оптимізації ми не враховуємо для реалізації на вітчизняному підприємстві.

2. Мікробіологічні шляхи оптимізації

Оптимізація умов культивування та складу середовища, спрямована на збільшення біомаси та синтезу лютеїну, можлива за рахунок, наприклад, збільшення концентрації вуглеводів із збільшенням азоту для відповідності вуглецевому пулу [2, 10, 11].

Розрахунок виходу лютеїну після оптимізації середовища

Підвищення меляси до 40 г/л (з 30 г/л) та кукурудзяного гідролізату до 10 г/л (з 7,5 г/л) за умови контролю осмосу, призведе до збільшення доступного вуглецю близько 30%, що підвищує біомасу до 12–15 г/л.

Розрахуємо потенційний вихід біомаси:

Глюкоза з меляси: $40 \times 50 / 100 = 20$ г/л, вуглець: $20 \times 72 / 180 = 8,0$ г/л.

Глюкоза з гідролізату: $10 \times 80 / 100 = 8,0$ г/л, вуглець: $8,0 \times 72 / 180 = 3,2$ г/л.

Глюкоза з автолізату: $6,5 \times 30 / 100 = 1,95$ г/л, вуглець: $1,95 \times 72 / 180 = 0,78$ г/л.

Сумарний вуглець: $8,0 + 3,2 + 0,78 = 11,98$ г/л.

Вуглець для біомаси: $11,98 / 2 = 5,99$ г/л \.

Біомаса: $5,99 / 0,5 = 12$ г/л.

Для 20 м³ (коефіцієнт заповнення 0,7): $12 \times 20\,000 \times 0,7 = 168\,000$ г = 168 кг.

Балансування азоту:

Збільшення (NH₄)₂SO₄ до 3,5 г/л для відповідності вуглецевому пулу.

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		40

Азот: $3,5 \times 0,212 = 0,742$ г/л + $0,65 = 1,392$ г/л.

Вихід за азотом: $1,392 / 0,1 = 13,92$ г/л.

Лімітувальний фактор: вуглець (12 г/л).

Але для таких високих концентрацій субстратів потрібно проведення пілотної серії з постійним контролем осмосу, також можливе виникнення субстратного інгібування. Тому для попередження цих ефектів рекомендованою є використання значно нижчою початковою концентрацією меляси із поступовим її збільшенням, зокрема поступове додавання меляси по 10 г/л кожні 12 год (періодичне культивування з підживленням - fed-batch fermentation) [18, 30].

Для підвищення виходу лютеїну можлива оптимізація умов ферментації з використанням кінетичних моделей, наприклад, рівнянь Моно для опису росту на основі споживання одного субстрату та для опису росту продуцента на основі споживання кількох субстратів, кінетичного рівняння за наявності конкурентного інгібування, рівняння логістичної кривої з припущенням про максимальну концентрацію росту клітин тощо [13, 30].

Враховуючи можливість інгібування субстратом, застосування потрібної моделі потребує збору великих даних із пілотних ферментацій, у реальній ситуації визначити, який саме продукт метаболізму гальмує розвиток культури і при цьому визначити його концентрацію є трудомісткою задачею і потребує визначення багатьох експериментальних констант [13].

В будь якому випадку збільшення біомаси шляхом точного контролю субстрату та аерації можливе при впровадженні датчиків для реального моніторингу глюкози та автоматичного додавання меляси через фід-батч систему.

3. Технологічні шляхи оптимізації спрямовані на зменшення втрат лютеїну та підвищення ефективності його виділення з культуральної рідини [14, 29].

Сучасні дослідження показують, що неполярні розчинники (гексан,

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
						41
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ацетон) ефективні для екстракції каротиноїдів, але комбінація з полярними розчинниками (етанол, метанол) підвищує вилучення лютеїну завдяки його помірній полярності. Оптимальна суміш, наприклад, гексан:ацетон:етанол (2:1:1), може збільшити вихід. Тому заміна поточного розчинника (гексана) на суміш гексан:ацетон:етанол (2:1:1) покращує проникнення в клітинні мембрани та підвищує розчинність лютеїну, що призводить до збільшення ефективності екстракції з 80% до 90%. [29]

Перспективною є і застосування ультразвукової екстракції. Ультразвук (20–40 кГц) руйнує клітинні стінки, полегшуючи вивільнення каротиноїдів. Це скорочує час екстракції та підвищує вихід на 20–30% порівняно з традиційними методами [29]. Адаптуючи до поточної технології можна застосувати ультразвукову обробку біомаси *Pantoea stewartii* у суміші розчинників (30 хв, 30 кГц, 50°C). Це зменшує втрати лютеїну через деградацію та покращує доступність пігменту, ефективність екстракції зростає до 92% (з 80%) завдяки руйнуванню клітин.

Сучасним методом є надкритична CO₂-екстракція. Надкритичний CO₂ (40–60 МПа, 40–60°C) є екологічно чистим методом із високою селективністю для каротиноїдів. Дослідження показують, що додавання етанолу як розчинника (5–10%) підвищує вихід лютеїну на 30–40%.

Заміна органічних розчинників на SFE з 5% етанолу як модифікатором зменшує деградацію лютеїну та втрати через термічну нестабільність з ефективністю до 95% (з 80% за поточною технологією), оскільки мінімізуються окислення та теплові втрати [29].

Одним із ефективних прийомів зниження втрат лютеїну при виділенні є його антиоксидантний захист під час екстракції. Лютеїн чутливий до окислення, тому пропонується додавання антиоксидантів (токоферол, аскорбінова кислота) для захисту каротиноїдів під час екстракції. Додавання 0,1% токоферолу до розчинника перед екстракцією зменшує втрати через окислення з 20% до 10% (ефективність 90%) [34].

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		42

Впровадження ультразвукової та надкритичної екстракції потребує встановлення дороговартісного обладнання та його інтеграцію в лінію екстракції, а, враховуючи витрати вітчизняного підприємства на облаштування обов'язкової у даній технології ділянки ферментації, ці додаткові витрати можуть призвести до тривалої окупності, тому для оптимізації процесу екстракції запропоновано використовувати попередню гомогенізацію з антиоксидантним захистом та комбінацією розчинників, що збільшить ефективність з 80% до 90%.

Розрахунок виходу лютеїну після оптимізації екстракції

Поточні параметри:

Біомаса - 128,52 кг ($9,18 \text{ г/л} \times 14\,000 \text{ л}$).

Продуктивність - $289,4 \text{ мкг/г} = 0,2894 \text{ мг/г}$.

Ефективність екстракції - 80%.

Вихід лютеїну - 29,755 г.

Теоретичний вихід лютеїну без втрат:

$128\,520 \times 0,2894 = 37\,193,688 \text{ мг} = 37,194 \text{ г}$

Вихід після оптимізації (90% ефективність):

$37,194 \times 0,90 = 33,475 \text{ г}$.

Таким чином, вихід лютеїну зростає у 1,13 разів. Але оптимізація лише екстракції не впливає на біомасу чи продуктивність штаму, тому зростання виходу обмежене (11,3 %).

Застосування інших технологічних прийомів для оптимізації технології також пов'язаний із дороговартісним обладнанням, тому не розглядається тут як реальний шлях оптимізації на вітчизняному підприємстві.

Таким чином, обрані стратегії включають:

1. Мікробіологічна оптимізація:

Збільшення концентрації меляси до 40 г/л та кукурудзяного гідролізату до 10 г/л.

Балансування азоту з $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 3,5 г/л.

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		43

Впровадження фед-батч ферментації з додаванням меляси по 10 г/л кожні 12 годин.

Потенційний вихід біомаси: 12 г/л (168 кг для ферментера 20 м³).

2. Технологічна оптимізація екстракції:

Використання комбінації розчинників (гексан:ацетон:етанол 2:1:1).

Антиоксидантний захист (0,1% токоферолу).

Ефективність екстракції: 90% (з 80%).

Генетичні шляхи оптимізації виключені через складність реалізації та регуляторні вимоги в Україні. Продуктивність штаму *Pantoea stewartii* залишиться на рівні 289,4 мкг/г, оскільки генетична модифікація не застосовується.

Розрахунок виходу лютеїну при біомасі 168 кг і продуктивності 289,4 мкг/г:

$$168\,000 \times 0,2894 = 48\,631,2 \text{ мг} = 48,631 \text{ г}$$

Вихід лютеїну після оптимізації екстракції (90% ефективність)

$$48,631 \times 0,90 = 43,7679 \text{ г.}$$

Таким чином, ми досягли зростання біомаси з 128,52 кг до 168 кг (збільшення у 1,31 разів), зростання виходу лютеїну з 29,755 г до 43,768 г (у 1,47 разів).

Слід зауважити, що дані розрахунки наведені для роботи 1 виробничого ферментера на 20 м³, а паралельна робота декількох ферментерів забезпечить потрібний вихід цільового продукту для забезпечення ринку.

3.1.2 Розрахунок кількості компонентів живильного середовища

Організація виробництва лютеїну пропонується на вітчизняному підприємстві з облаштуванням ділянки ферментації з урахуванням наявного на підприємстві хіміко-фармацевтичного обладнання для реалізації стадій виділення та очищення цільового продукту. Основними витратами на ділянці ферментації є витрати компонентів живильного середовища для отримання

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
						44
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

біомаси культури. Розрахуємо витрати середовища на забезпечення роботи 1 виробничого ферментера на 20 м³ (із можливістю подальшої паралельної роботи п'ятьох ферментерів).

Для розрахунку кількості живильного середовища та його компонентів, необхідних для отримання біомаси 168 кг штаму *Pantoea stewartii* з продуктивністю 289,4 мкг лютеїну на грам сухої ваги клітин у ферментері об'ємом 20 м³ (об'єм буде уточнено нижче), використаємо масштабування процесу ферментації через 4 генерації [6, 13]. Враховуємо: коефіцієнт заповнення ферментера - 0,7, втрати культуральної рідини на кожній стадії, у тому числі через краплевиніс - 10%, кількість посівного матеріалу - 10% від об'єму культуральної рідини.

Склад оптимізованого середовища (г/л): меляса – 40, кукурудзяний гідролізат – 10, (NH₄)₂SO₄ – 3,5, дріжджовий автолізат – 5, KН₂PO₄ – 1,5, Na₂HPO₄ – 1,0, MgSO₄·7H₂O – 0,5, FeSO₄·7H₂O – 0,01, CaCl₂·2H₂O – 0,02.

Розрахунок потреб живильного середовища

Головний ферментер (4-та генерація, 20 м³).

Робочий об'єм ферментера з коефіцієнтом заповнення 0,7:

$$V_{\text{роб}} = 20 \times 0,7 = 14 \text{ м}^3 = 14000 \text{ л}$$

Враховуючи втрати 10%, об'єм культуральної рідини (V_{к.р.1}):

$$V_{\text{к.р.1}} = 14 / 0,9 = 15,5556 \text{ м}^3$$

З цього об'єму:

Живильне середовище (V_{ж.с.1}):

$$V_{\text{ж.с.1}} = 15,5556 \times 1 = 15,5556 \text{ м}^3$$

Посівний матеріал (V_{п.м.1}):

$$V_{\text{п.м.1}} = 15,5556 - 14,1414 = 1,4142 \text{ м}^3.$$

Інокулятор (3-тя генерація).

Об'єм культуральної рідини для посівного матеріалу головного ферментера (V_{к.р.2} = V_{п.м.1}):

$$V_{\text{к.р.2}} = 1,4142 \text{ м}^3$$

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		45

Враховуючи втрати 10%:

$$V_{к.р.2}=1,41420,9=1,5713 \text{ м}^3$$

З цього об'єму:

Живильне середовище ($V_{ж.с.2}$):

$$V_{ж.с.2}=1,57131,1=1,4285 \text{ м}^3$$

Посівний матеріал ($V_{п.м.2}$):

$$V_{п.м.2}=1,5713-1,4285=0,1428 \text{ м}^3.$$

Посівний апарат (2-га генерація).

Об'єм культуральної рідини ($V_{к.р.3} = V_{п.м.2}$):

$$V_{к.р.3}=0,1428 \text{ м}^3.$$

Враховуючи втрати 10%:

$$V_{к.р.3}=0,14280,9=0,1587 \text{ м}^3$$

З цього об'єму:

Живильне середовище ($V_{ж.с.3}$):

$$V_{ж.с.3}=0,15871,1=0,1443 \text{ м}^3$$

Посівний матеріал ($V_{п.м.3}$):

$$V_{п.м.3}=0,1587-0,1443=0,0144 \text{ м}^3$$

Колби в лабораторії (1-ша генерація).

Об'єм культуральної рідини ($V_{к.р.4}=V_{п.м.3}$):

$$V_{к.р.4}=0,0144 \text{ м}^3=14,4 \text{ л}$$

Враховуючи втрати 10%:

$$V_{к.р.4}=0,01440,9=0,016 \text{ м}^3=16 \text{ л}$$

З цього об'єму:

Живильне середовище ($V_{ж.с.4}$):

$$V_{ж.с.4}=0,0161,1=0,0145 \text{ м}^3=14,5 \text{ л}$$

Посівний матеріал ($V_{п.м.4}$):

$$V_{п.м.4}=0,016-0,0145=0,0015 \text{ м}^3=1,5 \text{ л}$$

Сумарний об'єм живильного середовища для всіх стадій:

$$V_{ж.с.}=V_{ж.с.1}+V_{ж.с.2}+V_{ж.с.3}+V_{ж.с.4}$$

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
						46
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$V_{\text{ж.с.}} = 14,1414 + 1,4285 + 0,1443 + 0,0145 = 15,7287 \text{ м}^3 = 15\,728,7 \text{ л.}$$

Розрахунок кількості компонентів живильного середовища

Потреба у компонентах живильного середовища наведена у табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Витрати компонентів живильного середовища

№	Компонент середовища	Витрати на 1 л, г	Витрати на 1 серію, г
1	Меляса	40,0	629 148
2	Кукурудзяний гідролізат	10,0	157 287
3	(NH ₄) ₂ SO ₄	3,5	55 050
4	Дріжджовий автолізат	5,0	78 644
5	KH ₂ PO ₄	1,5	23 593
6	Na ₂ HPO ₄	1,0	15 729
7	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5	7 864
8	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01	157
9	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,02	315

3.2 Обґрунтування та вибір обладнання

Для розрахунку параметрів ферментерів, інокулятора, посівного апарата та колб, необхідних для реалізації процесу виробництва біомаси *Pantoea stewartii* (168 кг, вихід лютеїну 43,768 г), використаємо попередні розрахунки об'ємів культуральної рідини та живильного середовища для чотирьох генерацій ферментації. Об'єми культуральної рідини були визначені з урахуванням 10% втрат та 10% посівного матеріалу, а коефіцієнт заповнення для головного ферментера становить 0,7.

Головний ферментер (4-та генерація)

Робочий об'єм - об'єм культуральної рідини з втратами:

$$V_{\text{к.р.1}} = 15,5556 \text{ м}^3$$

Уточнюємо номінальний об'єм ферментера (з урахуванням коефіцієнта заповнення 0,7):

$$V_1 = 15,5556 / 0,7 = 22,2223 \text{ м}^3$$

Обираємо стандартний об'єм: $V_1 = 25 \text{ м}^3$

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
						47
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Параметри ферментера згідно з табличними даними:

діаметр апарата – $D = 2800$ мм,

площа поверхні теплообміну сорочки – $F = 38$ м²,

діаметр валу мішалки обирається із розмірів $d = 95, 110, 130$ мм,

висота рівня рідини - при $\varphi = 0,75$ $H = 3,28$ м, при $\varphi = 0,5$ $H = 2,26$ м.

Інокулятор (3-тя генерація)

Об'єм культуральної рідини: $V_{к.р.2}=1,5713$ м³

Номінальний об'єм: $V_2=1,5713/0,7=2,2447$ м³

Обираємо стандартний об'єм: $V_2=2,5$ м³

Параметри інокулятора:

діаметр апарата – $D = 1400$ мм,

площа поверхні теплообміну сорочки – $F = 7,8$ м²,

діаметр валу мішалки обирається із розмірів $d = 50, 65, 80$ мм,

висота рівня рідини - при $\varphi = 0,75$ $H = 1,33$ м, при $\varphi = 0,5$ $H = 0,93$ м.

Посівний апарат (2-га генерація)

Об'єм культуральної рідини: $V_{к.р.3}=0,1587$ м³

Номінальний об'єм: $V_3=0,1587/0,7=0,2267$ м³

Обираємо стандартний об'єм: $V_3=0,25$ м³.

Параметри посівного апарата:

діаметр апарата – $D = 700$ мм,

площа поверхні теплообміну сорочки – $F = 1,3$ м²,

діаметр валу мішалки - $d = 40$ мм,

висота рівня рідини - при $\varphi = 0,75$ $H = 0,5$ м, при $\varphi = 0,5$ $H = 0,38$ м.

Колби (1-ша генерація)

Об'єм культуральної рідини: $V_{к.р.4}=0,016$ м³=16 л, використовуємо 4 плоскодонні колби на 5 л.

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		48

3.3 Опис технологічного процесу

Біотехнологічний процес отримання лютеїну на основі рекомбінантної *Pantoea stewartii* з геном лікопен ϵ -циклази (168 кг, вихід лютеїну 43,768 г) із використанням оптимізованого живильного середовища та екстракцією комбінації розчинників (гексан:ацетон:етанол 2:1:1) та антиоксидантним захистом (0,1% токоферолу), а також додаванням 10 % мальтодекстрину як носія для забезпечення стабільності включає наступні стадії:

Стадія 1. Приготування живильного середовища

Стадія 2. Підготовка посівного матеріалу *Pantoea stewartii* (I генерація у колбах)

Стадія 3. Вирощування *Pantoea stewartii* у посівному апараті (II генерація)

Стадія 4. Вирощування *Pantoea stewartii* у посівному апараті (III генерація)

Стадія 5. Головна ферментація (IV генерація)

Стадія 6. Збір біомаси центрифугуванням

Стадія 7. Екстракція лютеїну

Стадія 8. Очистка та концентрація

Стадія 9. Ліофілізація лютеїну

Стадія 10. Пакування лютеїну (in-bulk)

Стадія 1. Приготування живильного середовища

Мелясу, кукурудзяний гідролізат, сульфат амонію, дріжджовий автолізат зважують згідно з рецептурою, розчиняють у воді очищеній у змішувачі, перемішують мішалкою 10 хв 110 об/хв. Мінеральні солі згідно з рецептурою розчиняють у воді очищеній у змішувачі. Розчини передають до реактора, регулюють рН, перемішують та стерилізують подачею гострої пари до сорочки (121°C, 20 хв).

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		49

Стадія 2. Підготовка посівного матеріалу *Pantoea stewartii* (І генерація у колбах)

У ламінарному боксі виробничої лабораторії роблять змив фізіологічним розчином культури *Pantoea stewartii* на скошеному агарі у пробірці. Отриману суспензію передають до пробірок із живильним середовищем, вирощують у термостаті 24 год, після чого отриманою маточною культурою (1,5 л) засівають 5 кочалочних колб із стерильним живильним середовищем загальним об'ємом 14,5 л. Вирощують у термостаті, температура 28–30°C, рН 6,8–7,0, час 24 год.

Стадія 3. Вирощування *Pantoea stewartii* у посівному апараті (II генерація)

Посівний матеріал із колб (14,4 л) переноситься в посівний апарат (0,25 м³) із живильним середовищем (144,3 л), де здійснюється контрольоване культивування з аерацією та періодичним перемішуванням. Умови - температура 28–30°C, рН 6,8–7,0, аерація 0,5–1,0 vvm, час 24 год, перемішування 150–200 об/хв.

Стадія 4. Вирощування *Pantoea stewartii* у інокуляторі (III генерація)

Культуру з посівного апарата (142,8 л) передають в інокулятор (2,5 м³) з живильним середовищем (1428,5 л) для подальшого розмноження біомаси перед головною ферментацією. Умови- температура 28–30°C, рН 6,8–7,0, аерація 0,5–1,0 vvm, час 24 год, перемішування 150–200 об/хв.

Стадія 5. Головна ферментація (IV генерація)

Культура з інокулятора (1,41 м³) вводиться в головний ферментер (25 м³) для максимального накопичення біомаси та синтезу лютеїну з додаванням м'яси (10 г/л кожні 12 год). Умови - температура 28–30°C, рН 6,8–7,0, аерація 1,0–1,5 vvm, час 72 год, перемішування 200–250 об/хв.

Стадія 6. Збір біомаси центрифугуванням

Після ферментації культуральна рідина (15 555,6 л) центрифугується для відокремлення біомаси від надосадової рідини на промисловій центрифугі

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		50

(потужність 5000–10 000 л/год), облаштованою насосом, резервуаром для надосадової рідини. Умови - температура 4–10°C, швидкість 10 000 об/хв, час 20–30 хв. Вихід біомаси становить 168 кг.

Стадія 7. Екстракція лютеїну

Біомаса гомогенізується у гомогенізаторі високого тиску (1000 бар), суміш передається до екстрактору з комбінацією розчинників (гексан:ацетон:етанол 2:1:1) із додаванням 0,1% токоферолу для захисту лютеїну від окислення. Умови - температура 50°C, час 30 хв, співвідношення біомаса:розчинник 1:10, ефективність 90%.

Стадія 8. Очистка та концентрація

Суміш (1680 л екстракту) передається до фільтр-преса для видалення залишків біомаси, центрифугат концентрується шляхом випарювання розчинників під вакуумом. Умови - температура 40°C, вакуум 0,1 бар, час 2–3 год. Вихід концентрованого екстракту 50 л.

Стадія 9. Ліофілізація лютеїну

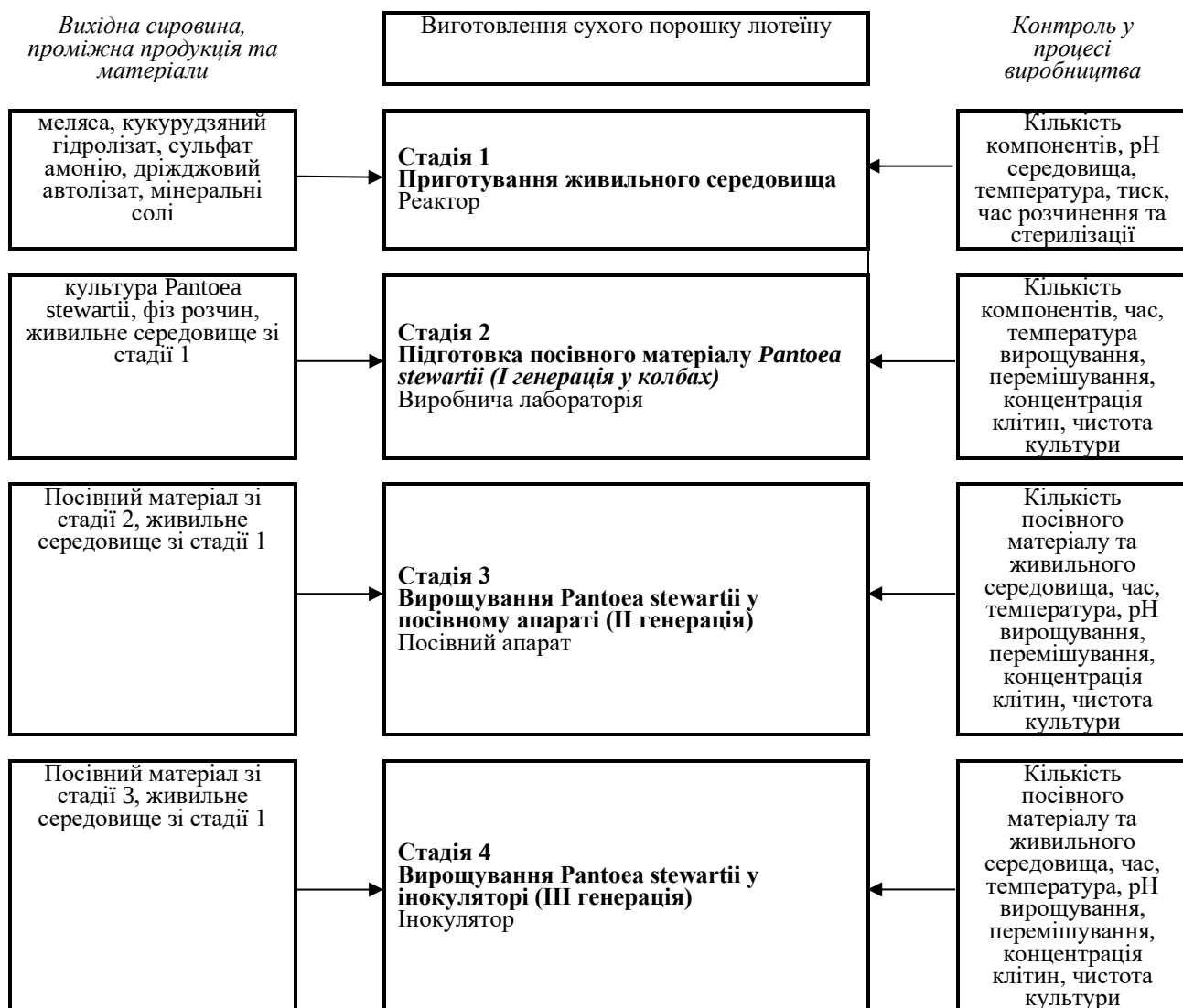
Отриманий концентрат сушиться з додаванням 10% мальтодекстрину як стабілізатор у ліофілізаторі (100 кг/цикл). Умови - температура -50°C, вакуум 0,01 мбар, час 24–48 год.

Стадія 10. Пакування лютеїну (in-bulk)

Сухий порошок фасується у герметичні контейнери для зберігання та транспортування на атоматичній фасувальній лінії. Порошок пакується в непрозорі алюмінієві пакети або темні скляні контейнери з низькою проникністю для кисню. Пакування проводиться під інертним газом (азот) для запобігання окисленню. Зберігання при температурі 4°C забезпечує стабільність до 36 місяців; для тривалого зберігання рекомендується -20°C.

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		51

3.4 Схеми виробництва



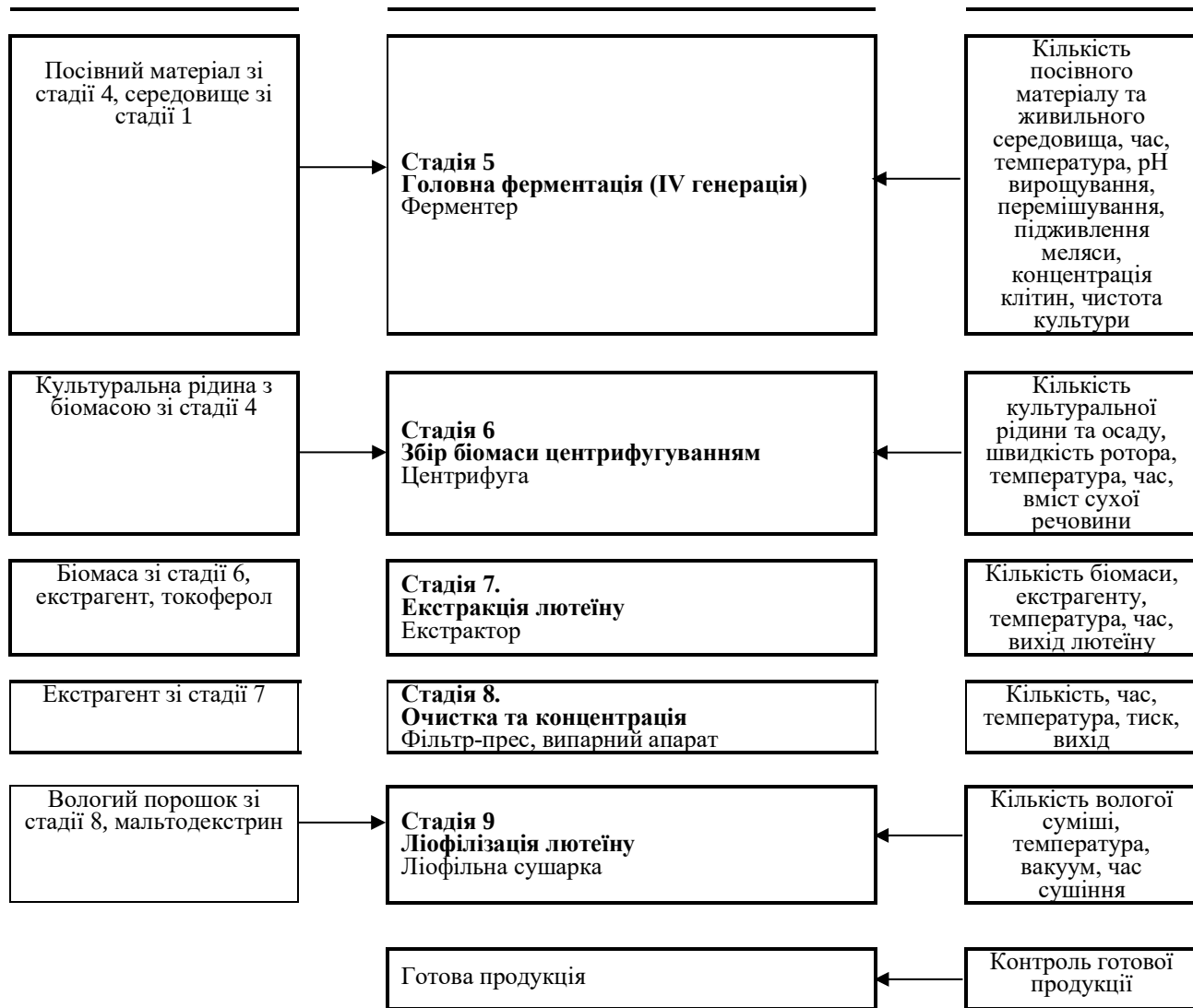


Рис. 3.1 – Технологічна схема виробництва лютеїну мікробним синтезом

3.5 Контроль виробництва

Контроль виробництва здійснюється на всіх етапах технологічного процесу для забезпечення відповідності якості вихідного продукту [2, 3, 6].

Вхідний контроль здійснюється для оцінки якості сировини та матеріалів перед їх введенням у технологічний процес для запобігання використання некондиційної сировини, що може вплинути на вихід і безпеку продукту. На вхідному контролі перевіряються наступні параметри:

Живильне середовище - концентрація компонентів (меляса, кукурудзяний гідролізат, солі), вологість, стерильність.

Розчинники - чистота гексану, ацетону, етанолу ($\geq 99\%$), відсутність домішок.

Антиоксиданти - вміст токоферолу ($0,1 \pm 0,02\%$), стабільність.

Носій - чистота мальтодекстрину ($> 95\%$), вологість ($< 5\%$).

Культура - життєздатність *Pantoea stewartii*.

Методи - хроматографія (ГХ-МС), титрування, мікробіологічні тести, обладнання - лабораторні ваги, спектрофотометр, автоклав, інкубатор.

Контроль проміжної продукції проводиться на ключових етапах культивування, збору біомаси та екстракції для забезпечення стабільності процесу. При контролі проміжної продукції перевіряються:

Посівний матеріал (стадія 2) - концентрація біомаси (1,0–1,5 г/л), стерильність (відсутність сторонньої мікрофлори).

Культура з посівного апарата (стадія 3) - біомаса (2–3 г/л), рН (6,8–7,0), аерація (0,5–1,0 vvm).

Культура з інокулятора (стадія 4) - біомаса (5–7 г/л), стерильність (відсутність сторонньої мікрофлори).

Біомаса після ферментації (стадія 6) - вихід (168 ± 5 кг), вологість ($< 10\%$).

Екстракт після екстракції (стадія 7) - ефективність ($90 \pm 2\%$), вміст токоферолу ($0,1 \pm 0,02\%$).

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		55

Методи - вимірювання біомаси (спектрофотометрія), рН-метрія, ХПК, обладнання - центрифуга, рН-метр, спектрофотометр.

Технологічний контроль здійснюється в реальному часі під час виконання операцій для корекції параметрів і запобігання відхилень. Включає:

Приготування середовища (стадія 1) - рН (6,8–7,0), стерильність (<10 КУО/мл), контроль ваги компонентів.

Ферментація (стадії 3–5) - температура (28–30°C), рН (6,8–7,0), аерація (0,5–1,5 vvm), концентрація глюкози (5–10 г/л), біомаса (12 г/л).

Екстракція (стадія 7) - температура (50±2°C), співвідношення біомаса:розчинник (1:10), ефективність (90±2%).

Ліофілізація (стадія 9) - температура (-50°C), вакуум (0,01 мбар), вологість (<5%).

Методи - датчики температури, рН, глюкози, манометри, вологоміри, обладнання - онлайн-датчики, термостати, вакуумні системи.

Контроль готової продукції

Контроль готової продукції проводиться після пакування для підтвердження відповідності лютеїну (87,536 г порошку) стандартам якості та безпеки. Перевіряються: вологість: <5%, вміст лютеїну: 90±2%, стерильність, маса - 87,536±1 г, стабільність - відсутність деградації.

Методи - хроматографія (ГХ-МС), вологомір, мікробіологічний аналіз, обладнання - аналітичні ваги, спектрофотометр, інкубатор.

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
						56
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Таблиця 3.3

Контроль критичних стадій і проміжної продукції

№	Критичні точки (стадії, операції)	Критичні параметри і характеристики якості	Одиниця виміру	Критерій прийнятності
1	Приготування живильного середовища	pH, стерильність	°, КУО/мл	6,8–7,0, <10 КУО/мл
2	Підготовка посівного матеріалу (колби)	Температура, концентрація біомаси	°С, г/л	28–30°С, 1,0–1,5 г/л
3	Вирощування у посівному апараті (II)	Температура, pH, аерація, біомаса	°С, °, vvm, г/л	28–30°С, 6,8–7,0, 0,5–1,0 vvm, 2–3 г/л
4	Вирощування у інокуляторі (III)	Температура, pH, аерація, біомаса	°С, °, vvm, г/л	28–30°С, 6,8–7,0, 0,5–1,0 vvm, 5–7 г/л
5	Головна ферментація (IV)	Температура, pH, аерація, біомаса, глюкоза	°С, °, vvm, г/л, г/л	28–30°С, 6,8–7,0, 1,0–1,5 vvm, 12 г/л, 5–10 г/л
6	Збір біомаси центрифугуванням	Вологість біомаси, вихід біомаси	%, кг	<10%, 168±5 кг
7	Екстракція лютеїну	Температура, ефективність екстракції, вміст токоферолу	°С, %, %	50±2°С, 90±2%, 0,1±0,02%
8	Очистка та концентрація	Концентрація лютеїну, чистота екстракту	г/л, %	0,8–1,0 г/л, >95%
9	Ліофілізація лютеїну	Вологість порошку, вміст лютеїну	%, %	<5%, 90±2%
10	Пакування лютеїну (in-bulk)	Вологість, стерильність, маса	%, КУО/г, г	<5%, <10 КУО/г, 87,536±1 г

3.6 Екологічні аспекти виробництва

Процес виробництва лютеїну мікробним синтезом на основі рекомбінантної *Pantoea stewartii* складається з 10 стадій, і його екологічний вплив оцінюється з точки зору викидів, відходів, споживання ресурсів та можливостей утилізації.

Споживання ресурсів. Процес потребує значних об'ємів води (близько

15700 л на цикл роботи виробничого ферментера) для приготування середовища, а також енергії для роботи ферментерів, центрифуги, ліофілізатора та вакуумних систем. Використання органічних розчинників (гексан, ацетон, етанол) підвищує екологічний слід. Однак сировина (меляса, кукурудзяний гідролізат) є відходами агропромисловості, що зменшує потребу в первинних ресурсах [8, 12, 16].

Викиди та відходи. Рідкі відходи - надосадова рідина після центрифугування (15555,6 л) містить органічні залишки (біомаса, невикористані субстрати), що потребує біологічного очищення перед зливом. Розчинники після екстракції підлягають регенерації або утилізації як небезпечні відходи. Тверді відходи - залишки біомаси (5–10 кг) та фільтраційні осади можуть бути використані як біодобрива після компостування. Газові викиди - аерація ферментерів (1,0–1,5 vvm) генерує CO₂ (біогенний), який частково поглинається при біологічному очищенні стічних вод [8, 12, 16].

Вплив на навколишнє середовище. Використання органічних розчинників (гексан, ацетон, етанол) може спричинити забруднення повітря та ґрунтів у разі витіку, якщо не дотримуватися герметичності. Етанол, як біоорганічна сполука, підлягає регуляції в Україні. Енергоспоживання (особливо на стадіях ферментації та ліофілізації) сприяє викидам парникових газів, якщо джерело енергії не є відновлюваним.

До заходів з мінімізації екологічного впливу можна віднести: регенерацію розчинників (встановлення системи ректифікації для повторного використання гексану, ацетону та етанолу), очищення стоків (використання біологічних очисних споруд для переробки надосадової рідини), енергозбереження (оптимізація аерації та використання теплообмінників для утилізації тепла від ферментації), утилізація відходів (компостування біомаси та солей для виробництва добрив), перехід на біоетанол (із відновлюваних джерел для зменшення вуглецевого сліду) [8, 12, 16].

Процес має позитивний аспект завдяки використанню відходів

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		58

агропромисловості (м'яса, гідролізат), що сприяє циклічній економіці. Викид CO₂ є біогенним і не додає значного вуглецевого сліду. У відповідності до стандартів ISO 14001, рекомендується розробити план управління відходами та проводити регулярний моніторинг викидів.

Біотехнологічний процес отримання лютеїну є відносно екологічно безпечним завдяки використанню вторинної сировини, але потребує вдосконалення у сфері утилізації розчинників та енергозбереження. Впровадження регенерації та біологічного очищення дозволить зменшити вплив на довкілля та зробити виробництво більш сталим.

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		59

ВИСНОВОК

У результаті проведеної роботи розроблено та оптимізована біотехнологічна технологія отримання лютеїну з рекомбінантної *Pantoea stewartii* з геном лікопен ε -циклази. Процес базується на використанні живильного середовища на основі меляси, кукурудзяного гідролізату, автолізату дріжджів, сульфату амонію та мінеральних солей та включає 10 стадій: приготування середовища, культивування через чотири генерації (колби, посівний апарат, інокулятор, ферментер), збір біомаси, екстракцію з комбінацією розчинників (гексан:ацетон:етанол 2:1:1) з антиоксидантним захистом (0,1% токоферолу), очищення, ліофілізацію з додаванням 10% мальтодекстрину та пакування.

Розраховано необхідні об'єми апаратів, які необхідні для реалізації вирощування культури, та кількість сировини, що забезпечує ефективне масштабування процесу. Встановлено оптимальні умови культивування та екстракції, що сприяють максимальному виходу продукту. Розроблено систему контролю якості, включаючи вхідний контроль сировини, моніторинг проміжної продукції, технологічний контроль параметрів та контроль готової продукції.

Екологічний аналіз виявив основні джерела впливу і запропоновано заходи мінімізації, такі як регенерація розчинників та біоочищення стоків. Використання агропромислових відходів сприяє циклічній економіці, знижуючи потребу в первинних ресурсах.

Практичне значення роботи полягає в створенні технології, яка може бути впроваджена в Україні для виробництва конкурентоспроможного продукту, сприяючи імпортозаміщенню та сталому розвитку біотехнологій. Отримані результати можуть бути використані для промислового виробництва лютеїну для фармацевтичної та харчової індустрій, а також слугувати основою для подальших досліджень щодо підвищення ефективності процесу.

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
						60
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Горупа В. В. Конструкція обладнання біотехнологічних виробництв : практикум для студентів. Київ : НАУ, 2017. 64 с.
2. Капрельянц Л. В. Теоретичні основи біотехнології : навч. посіб. Харків : Факт, 2020. 296 с.
3. Красінько В. О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв : конспект лекцій. Київ : НУХТ, 2019. 252 с.
4. Методичні рекомендації до виконання кваліфікаційної роботи бакалавра для здобувачів вищої освіти спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» ОП «Біотехнологія» / О. С. Калюжная та ін. Харків : НФаУ, 2024. 128 с.
5. Іванов Є. Г. Нормативне забезпечення біотехнологічних виробництв : навч. посіб. Харків : ХНУ ім. В. Н. Каразіна, 2024. 100 с.
6. Карлаш Ю. В., Красінько В. О. Основи проектування біотехнологічних виробництв : навч. посіб. Київ : НУХТ, 2022. 373 с.
7. Небезпечний шкідливий організм кукурудзи – бактеріальний вільт кукурудзи *Pantoea stewartii* (Smith): Головне управління Держпродспоживслужби в Київській області. URL: <https://dpssko.gov.ua/blog/2022/07/18/%D0%BD%D0%B5%D0%B1%D0%B5%D0%B7%D0%BF%D0%B5%D1%87%D0%BD%D0%B8%D0%B9-%D1%88%D0%BA%D1%96%D0%B4%D0%BB%D0%B8%D0%B2%D0%B8%D0%B9-%D0%BE%D1%80%D0%B3%D0%B0%D0%BD%D1%96%D0%B7%D0%BC-%D0%BA%D1%83%D0%BA%D1%83/> (Дата доступу: 15.03.2025).
8. Пляцук Л. Д., Черниш Є. Ю. Екологічна біотехнологія: принципи створення біотехнологічних виробництв : навч. посіб. Суми : Сумський держ. ун-т, 2018. 293 с.

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		61

9. Пирог Т. П. Загальна мікробіологія : підручник. 2–ге вид., допов. та перероб. Київ : НУХТ, 2010. 632 с.

10. Пирог Т. П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія : підручник. Київ : НУХТ, 2009. 336 с.

11. Процеси, апарати та устаткування біотехнологічних виробництв – 1. Процеси і апарати біотехнологічних виробництв. Практикум : навч. посіб. для здобувачів ступеня бакалавр за спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія», освітньої програми «Біотехнології» / Л. І. Ружинська та ін. Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2023. 66 с.

12. Рильський О. Ф., Петруша Ю. Ю., Домбровський К. О. Екологічна біотехнологія : навч. посіб. Запоріжжя : ЗНУ, 2023. 83 с.

13. Сидоров Ю. І., Влязло Р. Й., Новіков В. П. Процеси і апарати мікробіологічної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Ч. І. Ферментація. Львів : Львів. політехніка, 2004. 240 с.

14. Сидоров Ю. І., Влязло Р. Й., Новіков В. П. Процеси і апарати мікробіологічної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Ч. II. Обробка культуральних рідин. Львів : Львів. політехніка, 2004. 296 с.

15. Сидоров Ю. І., Влязло Р. Й., Новіков В. П. Процеси і апарати мікробіологічної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Ч. III. Основи проектування мікробіологічних виробництв. Львів : Львів. політехніка, 2004. 252 с.

16. Технологічне обладнання біотехнологічної і фармацевтичної промисловості : підручник / М. В. Стасевич та ін. Львів : Новий Світ-2000, 2018. 410 с.

17. Biology, Diagnostics, Pathogenomics and Mitigation Strategies of Jackfruit-Bronzing Bacterium *Pantoea stewartii* subspecies *stewartii*: What Do We Know So Far about This Culprit? / R. Ibrahim et al. *Horticulturae*. 2022. Vol. 8(8). P. 702. DOI: <https://doi.org/10.3390/horticulturae8080702>.

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		62

18. Bioprocess Operation Modes: Batch, Fed-batch, and Continuous Culture: Eppendorf. URL: <https://www.labx.com/resources/the-best-biotechnology-equipment-a-buyers-guide-to-price-and-features/4964> (Data of acces: 15.03.2025).

19. Biotechnological Potential of Carotenoids Produced by Extremophilic Microorganisms and Application Prospects for the Cosmetics Industry / T. Mendes-Silva et al. *Advances in Microbiology*. 2020. Vol. 10(8). P. 397–410. DOI: 10.4236/aim.2020.108029.

20. Cardoso L. A. C., Kanno K. Yu. F., Karp S. G. Microbial production of carotenoids – A review. *African Journal of Biotechnology*. 2017. Vol. 16(4). P. 139–146. DOI: 10.5897/AJB2016.15763.

21. Carruthers D. N., Lee T. S. Diversifying Isoprenoid Platforms via Atypical Carbon Substrates and Non-model Microorganisms. *Front. Microbiol.* 2021. Vol. 12. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.791089>.

22. Colorful Treasure From Agro-Industrial Wastes: A Sustainable Chassis for Microbial Pigment Production / J. Grewal et al. *Front Microbiol.* 2022. Vol. 31(13). P. 832918. DOI: 10.3389/fmicb.2022.832918.

23. Insights into the synthesis, engineering, and functions of microbial pigments in Deinococcus bacteria / Y. Wang et al. *Front Microbiol.* 2024. Vol. 15. P. 1447785. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1447785.

24. Li Y., Wang. G. Strategies of isoprenoids production in engineered bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 2016. Vol. 121(4). P. 932-940. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.13237>.

25. Main Carotenoids Produced by Microorganisms / S. Martínez-Cámara et al. *Encyclopedia*. 2021. Vol. 1(4). P. 1223–1245. DOI: 10.3390/encyclopedia1040093.

26. Microbial Carotenoids Production: Strains, Conditions, and Yield Affecting Factors / S. Raira et al. *Environmental and Climate Technologies*. 2023. Vol. 27(1). P. 1027–1048 DOI: 10.2478/rtuct-2023-0075 <https://content.sciendo.com>.

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		63

27. Microalgal lutein biosynthesis: Recent trends and challenges to enhance the lutein content in microalgal cell factories / A. Patel et al. *Sec. Marine Biotechnology and Bioproducts*. 2022. Vol. 9. DOI: 10.3389/fmars.2022.1015419.

28. Microbiological Synthesis of Carotenoids: Pathways and Regulation / P. Córdova et al. 2018. URL: <https://www.intechopen.com/chapters/61853> (Date of access: 20.01.2025).

29. Morón-Ortiz Á., Mapelli-Brahm P., Meléndez-Martínez A. J. Sustainable Green Extraction of Carotenoid Pigments: Innovative Technologies and Bio-Based Solvents. *Antioxidants*. 2024. Vol. 13(2). P. 239. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox13020239>.

30. Optimization and Scale-Up of Fermentation Processes Driven by Models / Du Y.-H. et al. 2022. *Bioengineering*. 2022. Vol. 9(9). P. 473. DOI: <https://doi.org/10.3390/bioengineering9090473>.

31. Optimization, characterization and biosafety of carotenoids produced from whey using *Micrococcus luteus* / A. A. Hegazy et al. *BMC Biotechnology*. 2024. Vol. 24(1). P. 74. DOI: 10.1186/s12896-024-00899-6.

32. Pathway Engineering for High-Yield Production of Lutein in *Escherichia coli* / M. Takemura et al. *Synthetic Biology*. 2021. Vol. 6(1). DOI: 10.1093/synbio/ysab012.

33. Production of lutein in microorganisms : Pat. No: US 2003/0207947 A1 United States : No. 60/187.576, filed on 07.03.2000; Pub. Date: 06.11.2003. 16 p.

34. Production of lutein in microorganisms : Pat. No. WO2001066703A1 United States : No. C12N 9/02, filed on 07.03.2000; Pub. Date: 13.09.2001. 37 p.

35. Promsai S., Promnuan Y., Meelai S. Feasibility of Carotenoid Production by Novel Yeast, *Occultifur* sp. M2004, for Nutraceutical Applications. *Curr. Res. Nutr Food Sci Jour.* 2024. Vol. 12(3). P. 1248–1260. DOI: 10.12944/CRNFSJ.12.3.21.

					162.02.06.00 000 ПЗ	Арк.
						64
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

36. Roper M. C. *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*: lessons learned from a xylem-dwelling pathogen of sweet corn. *Mol Plant Pathol.* 2011. Vol. 12(7). P. 628–637. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2010.00698.x.

37. Sundararajan P., Ramasamy S. P. Current perspectives on industrial application of microbial carotenoid as an alternative to synthetic pigments. *Sustainable Chemistry and Pharmacy.* 2024. Vol. 37. P. 101353. DOI: 10.1016/j.scp.2023.101353.

38. The Best Biotechnology Equipment: A Buyer's Guide to Price and Features. URL: <https://www.labx.com/resources/the-best-biotechnology-equipment-a-buyers-guide-to-price-and-features/4964> (Data of acces: 16.03.2025).

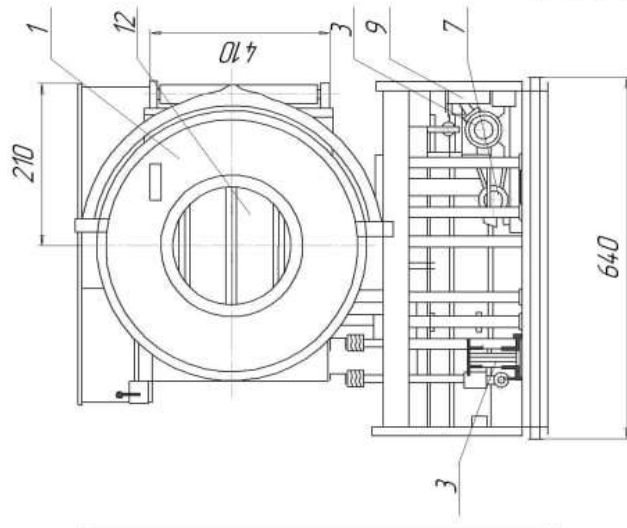
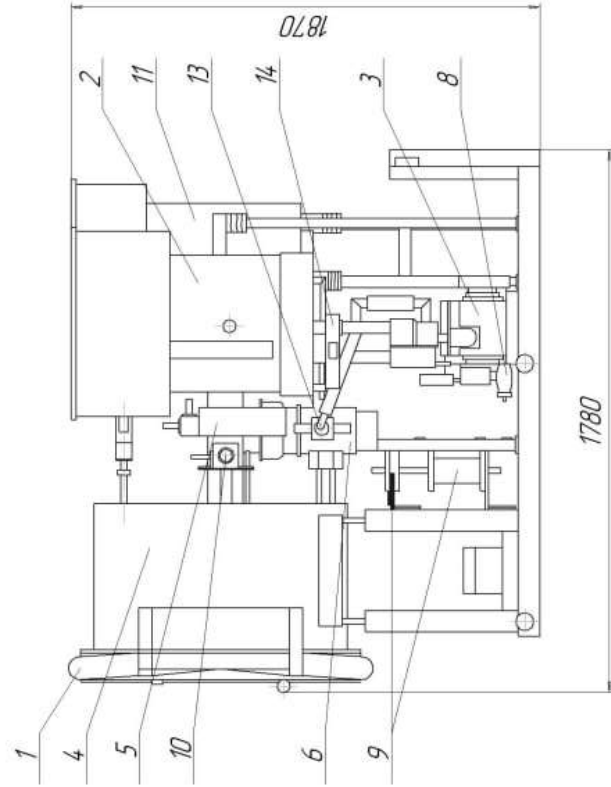
39. The Transcription Factor Lrp of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* Controls Capsule Production, Motility, and Virulence Important for in planta Growth / Bartholomew H. P. et al. *Front Microbiol.* 2022. Vol. 12(806504). DOI: 10.3389/fmicb.2021.806504.

40. Unveiling the Intricacies of Microbial Pigments as Sustainable Alternatives to Synthetic Colorants: Recent Trends and Advancements / Anshi et al. *Micro.* 2024. Vol. 4(4). P. 621–640. DOI: 10.3390/micro4040038.

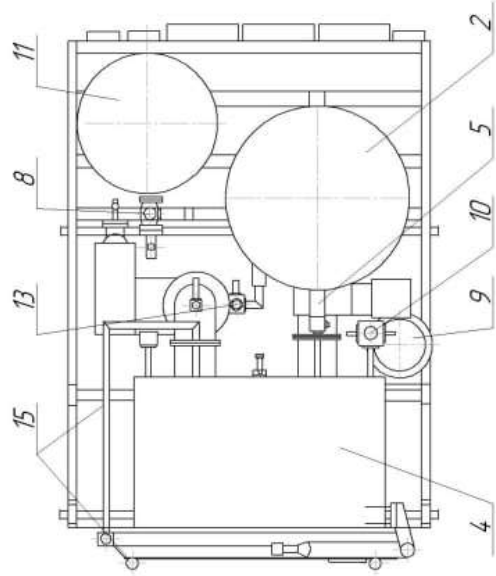
41. Zhang C. Biosynthesis of Carotenoids and Apocarotenoids by Microorganisms and Their Industrial Potential. From the Edited Volume *Progress in Carotenoid Research.* 2018. DOI: 10.5772/intechopen.79061.

					162.02.06.00 000 ІІЗ	Арк.
						65
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ДОДАТКИ



Заст. істота	Парасито	Перелік складових частин	Кліт. н-сть	Примітка
1		Діагно		
2		Контрагент		
3		Наст. дикунний		
4		Апери сшислю		
5		Апери настичний		
6		Наст. дифузійно		
7		Масляни		
8		Електроліз		
9		Діагност. наст		
10		Наст. перенос		
11		Функц. підтрим		
12		Кліт. функц. підтр		
13		Гемостат		
14		Гемол		
15		Вікно		
16		Вікно дф		
17		Масл. наст		
18		Апери висонний		
19		Контрагент		
20		Діагност. наст		
21		Апери настичний		

[illegible]