

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
СУМСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет агротехнологій та природокористування
Кафедра біотехнології та хімії

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
СУМСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет агротехнологій та природокористування
Кафедра біотехнології та хімії

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

за першим рівнем вищої освіти

на тему:

«Технологія виробництва вітаміну В12»

Виконав

Щербаченко І.О.

Група

БІО2001

Науковий керівник

Пономарьова Л.М.

Рецензент

Бакуменко О.М.

Суми – 2024

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
СУМСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

Факультет *агротехнологій та природокористування*

Кафедра *біотехнології та хімії*

Освітній рівень - «Бакалавр»

Спеціальність: 162 – «Біотехнології та біоінженерія»

ЗАТВЕРДЖУЮ:

В.п.завідувач кафедри

_____ **Коваленко В.М.**

« _____ » _____ **2024** р.

ЗАВДАННЯ

на кваліфікаційну роботу

Щербаченко Ірини Олександрівни

1. Тема роботи: «Технологія виробництва вітаміну В12»

Затверджено наказом по університету від « ____ » _____ 2024 р. № _____

2. Термін здачі студентом закінченої роботи на кафедрі _____

3. Вихідні дані до роботи: кінцевий продукт – кристалічний вітамін В12, що використовується в якості біологічної добавки; ферментер для промислового культивування ; спосіб очистки продукту – метод екстрагування.

-місце проведення досліджень: _____

-методичне забезпечення: _____

4. Перелік питань, які будуть виконуватись у роботі:

- 1) Провести літературний огляд;
- 2) Навести опис синтезу вітаміну В12 мікроорганізмами-продуцентами;
- 3) Розглянути основні характеристики промислового виробництва кобаламіну;
- 4) Запропонувати шляхи оптимізації виробництва.

Керівник кваліфікаційної роботи _____ (Пономарьова Л.М.)

Завдання прийняв до виконання _____ (Щербаченко І.О.)

Дата отримання « ____ » _____ 202 р.

АНОТАЦІЯ

Метою даної дипломної роботи є дослідження та опис технологічного процесу виробництва вітаміну В12.

Об'єкт дослідження: технологія виробництва водорозчинного вітаміну кобаламіну.

Предмет дослідження: вивчення процесу біосинтезу вітаміну В12, порівняти об'єми виходу виробництва кобаламіну різними мікроорганізмами .

У даній кваліфікаційній роботі розглядається процес біосинтезу, очищення готової продукції вітаміну В₁₂. Спочатку розглядається історичний огляд досліджень вітаміну В₁₂ і основну характеристику двох сімейств мікроорганізмів, які зазвичай використовуються для промислового виробництва кобаламіну: *Propionibacterium freudenreichii*, *Pseudomonas denitrificans*. Описано основні характеристики біосинтезу вітаміну В₁₂ на промисловому виробництві, а також основні досягнення та проблеми для його вдосконалення, з акцентом на оптимізації біопроектів, яка спрямована не лише на збільшення виробництва, але й на покращення його стабільності. Крім того, надається перелік найбільш важливих і актуальних патентів на поточні промислові штами. Також наведена економічна характеристика світового ринку виробництва кобаламіну.

Ключові слова: вітамін В₁₂, кобаламін, ціанкобаламін, *pseudomonas denitrificans*, *propionibacterium freudenreichii*.

ABSTRACT

The purpose of this thesis is research and description of the technological process of vitamin B12 production.

Research object: production technology of water-soluble vitamin cobalamin.

The subject of the research: study of the biosynthesis process of vitamin B12, to compare the output volumes of cobalamin production by different microorganisms.

This qualification work examines the process of biosynthesis, purification of finished products of vitamin B12. First, a historical overview of research on vitamin B 12 and the main characteristics of two families of microorganisms that are commonly used for the industrial production of cobolamine are considered: *Propionibacterium freudenreichii*, *Pseudomonas denitrificans*. The main characteristics of the biosynthesis of vitamin B 12 in industrial production are described, as well as the main achievements and problems for its improvement, with an emphasis on the optimization of bioprocesses, which is aimed not only at increasing production, but also at improving its stability. In addition, a list of the most important and relevant patents on current industrial strains is provided. The economic characteristics of the world market of cobalamin production are also given.

Key words: vitamin B12, cobalamin, cyanocobalamin, *pseudomonas denitrifican*, *propionibacterium freudenreichii*.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. Характеристика кінцевого продукту.....	9
1.1. Основні відомості про вітаміни	9
1.2. Історія відкриття вітамінів.....	10
1.3. Вітамін В 12 - його структура та біологічна роль	12
1.4. Історія відкриття вітаміну В12	14
1.5. Хімічна структура вітаміну В12.....	16
1.6. Значення вітаміну В12 та хвороби викликані дефіцитом вітаміну	18
РОЗДІЛ 2. Характеристика мікроорганізмів продуцентів вітаміну В12	19
2.1. Propionibacterium freudenreichii.....	19
2.1.1. Систематичне положення	19
2.1.2. Морфологія:	19
2.1.3. Культуральні характеристики:	20
2.1.4. Біохімічні характеристики:	20
2.1.5. Фізіолого-біохімічні ознаки.....	20
2.1.6. Поширення в природі.....	21
2.2. Pseudomonas denitrificans.....	22
2.2.1. Систематичне положення	22
2.2.2. Морфологія:	22
2.2.3. Культуральні характеристики:	22
2.2.4. Біохімічні характеристики:	23
2.2.5. Фізіолого-біохімічні ознаки.....	23
2.1.6. Поширення в природі.....	24
РОЗДІЛ 3. Технологія виробництва вітаміну В12.....	25

3.1. Мікробіологічне виробництво вітаміну В 12 : аеробний і анаеробний шляхи	25
3.2 .Оптимізація біопроцесу для виробництва ціанокобаламіну	28
3.3. Мікробне виробництво в <i>Pseudomonas denitrificans</i>	31
3.4. Мікробне виробництво в <i>Propionibacterium freudenreichii</i>	36
3.5. Стратегії подальшої обробки та постмодифікації вітаміну В 12	38
РОЗДІЛ 4. Економічна характеристика світового ринку виробництва кобаламіну	41
4.1.Світовий ринок кобаламіну	41
4.2.Динаміка ринку	42
4.3.Криза ланцюга поставок на світовому ринку	44
4.3.Статистика продажу вітаміну В 12 в залежності від форми випуску	44
ВИСНОВКИ	46
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	48
ДОДАТКИ.....	54

ВСТУП

Вітамін В12, також відомий як кобаламін, є важливою поживною речовиною, необхідною для багатьох організмів, включаючи людей. Він відіграє важливу роль у функціонуванні нервової системи, кровотворення та інших процесах в організмі. Ця молекула була вперше представлена як протитрута проти злякисної анемії на початку 1920-х років — відкриття приписують двом американським лікарям Майноту та Мерфі. Вони продемонстрували його цілющі властивості при перніціозній анемії, хворобі, існування якої сягає 1835 року. Їхній метод передбачав введення в раціон сирової печінки. Ця історична подія підкреслює потужність вітаміну В12 і те, скільки часу знадобилося, щоб його переваги були виявлені.

Кобаламін або вітамін В12 є водорозчинною молекулою, необхідною для метаболізму багатьох живих організмів завдяки своїй складній структурі та заплутаному біосинтезу. Шлях біосинтезу цієї молекули складається з понад тридцяти етапів біотрансформації та є унікальним лише для певних бактерій і архей, оскільки не всі типи синтезу є спорідненими, що робить неможливим її виробництво для ссавців.

Єдиний спосіб отримання вітаміну В12 - ферментація. Він синтезується різними фармацевтичними гігантами, щоб задовольнити світовий річний попит. Вже в 1959 році компанія Merck & Co. розпочала перше промислове виробництво вітаміну В12. Цей важливий крок значно покращив доступність вітаміну В12 для людей у всьому світі, що призвело до лікування перніціозної анемії та інших дефіцитних станів. Пізніше вони підвищили ефективність культури більш ніж у 30 разів завдяки генетичним маніпуляціям і методам мікробіологічного скринінгу, що значно перевершує те, що було досягнуто природним шляхом за допомогою ґрунтових ізолятів.

Збільшення кількості випадків дефіциту вітаміну В12 серед людей з різних країн і різних вікових груп призвело до збільшення попиту на харчові добавки та інші вітамінні продукти. Людям похилого віку з целиакією та

хворобою Крона можуть призначатися регулярні добавки вітаміну В12. Окрім утворення мієліну, розвитку та функціонування центральної нервової системи, еритропоезу та регуляції обміну речовин, цей водорозчинний вітамін може лікувати анемію у літніх жінок. Люди, які не в змозі засвоювати вітамін В12 ,отриманий природнім шляхом ,як правило ,відчувають нестачу вітамінів ,що проявляється різними симптомами, такими як , втома, слабкість, погіршення зору, оніміння, пітливість, лихоманка і труднощі при ходьбі. Крім того, очікується, що симптоми дефіциту вітаміну В12, такі як порушення травлення, задишка, перепади настрою, депресія та блідість шкіри ,призведуть до збільшення попиту на харчові добавки на основі вітаміну В12 та здорову їжу. З огляду на ці причини, удосконалення технологій, пошук кращих штамів-продуцентів та оптимізація біопроектів виробництва вітаміну В12 є актуальними для забезпечення населення якісними біологічними добавками.

РОЗДІЛ 1

Характеристика кінцевого продукту

1.1. Основні відомості про вітаміни

Вітамін - це поживна речовина, яка є органічною сполукою, необхідною в невеликих кількостях для важливих метаболічних реакцій у живому організмі. Більшість вітамінів неможливо отримати в достатній кількості шляхом синтезу в організмі, тому вони повинні надходити з їжею. Таким чином, термін залежить від обставин і конкретного живого організму. Наприклад, аскорбінова кислота функціонує як вітамін С для одних тварин, але не для інших, а вітаміни D і К потрібні в раціоні людини лише за певних обставин. Вітаміни визначаються їхньою біологічною активністю, а не структурою. Таким чином, кожен «вітамін» фактично відноситься до ряду вітамінних сполук, які утворюють набір різних хімічних сполук, які демонструють біологічну активність певного вітаміну. Такий набір хімічних речовин згруповано під назвою «загальний дескриптор» вітаміну в алфавітному порядку, наприклад «вітамін А», який (наприклад) включає ретиналь, ретинол і багато каротиноїдів. [1] Вітамери часто взаємоперетворюються в організмі. Термін вітамін не включає інші необхідні поживні речовини, такі як дієтичні мінерали, незамінні жирні кислоти або незамінні амінокислоти, а також не охоплює велику кількість інших поживних речовин, які зміцнюють здоров'я, але не необхідні для життя.

Вітаміни виконують різноманітні біохімічні функції, включаючи функцію гормонів (наприклад, вітамін D), антиоксидантів (наприклад, вітамін E), медіаторів клітинної сигналізації та регуляторів росту та диференціювання клітин і тканин (наприклад, вітамін A). Найбільша кількість вітамінів (наприклад, вітаміни комплексу B) функціонують як попередники для біомолекул кофакторів ферментів (коферментів), які допомагають діяти як каталізатори та субстрати в метаболізмі. Діючи як частина каталізатора, вітаміни пов'язані з ферментами і називаються простетичними групами.

Наприклад, біотин входить до складу ферментів, які беруть участь у виробленні жирних кислот. Вітаміни також діють як коферменти для перенесення хімічних груп між ферментами. Наприклад, фолієва кислота несе в клітині різні форми вуглецевих груп – метил, формил і метилен. Хоча ці функції сприяння ферментативним реакціям є найвідомішою функцією вітамінів, інші функції вітамінів є не менш важливими. [2]

1.2. Історія відкриття вітамінів

Значення вживання певних продуктів для підтримки здоров'я було визнано задовго до того, як були ідентифіковані вітаміни. Стародавні єгиптяни знали, що годування пацієнта печінкою допоможевилікувати курину сліпоту, хворобу, яка, як відомо, спричинена дефіцитом вітаміну А. З розвитком морських подорожей в епоху Відродження призвело до тривалих періодів відсутності доступу до свіжих фруктів і овочів, а також до того, що хвороби, пов'язані з дефіцитом вітамінів, стали поширеними серед екіпажу корабля.[3]

У 1749 році шотландський хірург Джеймс Лінд виявив, що цитрусові допомагають запобігти цинзі, особливо смертельному захворюванню, при якому колаген не утворюється належним чином, що спричиняє погане загоєння ран, кровоточивість ясен, сильний біль і смерть. У 1753 році Лінд опублікував свій «Трактат про цингу», в якому рекомендував використовувати лимони та лайми, щоб уникнути цинги, що було прийнято Британським королівським флотом. Через це моряки цієї організації отримали прізвисько Лаймі. [4]

У 1881 році російський хірург Микола Лунін вивчав наслідки цинги, перебуваючи в Тартуському університеті в сучасній Естонії. Він годував мишей штучною сумішшю всіх відомих на той час окремих складових молока, а саме білків, жирів, вуглеводів і солей. Миші, які отримували тільки окремі компоненти, гинули, а миші, яких годували самим молоком, розвивалися нормально. Він зробив висновок, що «природна їжа, така як молоко, повинна містити, крім цих відомих основних інгредієнтів, невелику кількість невідомих речовин, необхідних для життя». Однак його висновки були відхилені іншими

дослідниками, коли вони не змогли відтворити його результати. Однією з відмінностей було те, що він використовував столовий цукор (сахарозу), тоді як інші дослідники використовували молочний цукор (лактозу), який містив невелику кількість вітаміну В.

На Сході, де шліфований білий рис був основною їжею середнього класу, авітаміноз, викликаний нестачею вітаміну В, був ендемічним. У 1884 році Такакі Канехіро, британський медичний лікар японського флоту, зауважив, що авітаміноз був ендемічним серед екіпажу нижчого рангу, який часто не їв нічого, крім рису, тоді як команди західного флоту та офіцери, які мали право на західну дієту, не хворіли. Канехіро спочатку вважав, що головною причиною авітамінозу є нестача білка. За підтримки японського флоту він експериментував з екіпажами двох лінійних кораблів, один екіпаж харчувався лише білим рисом, а інший — м'ясом, рибою, ячменем, рисом і бобами. Група, яка їла лише білий рис, задокументувала 161 члена екіпажу з авітамінозом і 25 смертей, тоді як в останній групі було лише 14 випадків авітамінозу і жодної смерті. Це переконало Канехіро та японський флот, що дієта є причиною авітамінозу. Фредерік Хопкінс зазначив, що деякі харчові продукти містять «допоміжні фактори» — на додаток до білків, вуглеводів, жирів тощо — які необхідні для функціонування людського організму. Хопкінс був удостоєний Нобелівської премії з фізіології та медицини 1929 року разом із Крістіаном Ейкманом за відкриття кількох вітамінів. [4]

На початку 1900-х років використання досліджень депривації дозволило вченим виділити та ідентифікувати низку вітамінів. Спочатку для лікування рахіту у щурів використовували ліпіди з риб'ячого жиру, а жиророзчинну поживну речовину називали «антирахітичним А». Іронія полягає в тому, що перший виділений «вітамін», який вилікував рахіт, спочатку називався «вітамін А», біоактивність якого тепер називається вітаміном D. Те, що ми зараз називаємо «вітамін А», було виявлено в риб'ячому жирі, оскільки він був інактивований ультрафіолетовим світлом. У 1931 році Альберт Сент-Дьєрды та його колега-дослідник Джозеф Свірбелі визначили, що «гексууронова кислота»

насправді є вітаміном С , і відзначили її протицинготну дію . У 1937 році Сент-Дьєрдь був удостоєний Нобелівської премії за своє відкриття. У 1943 році Едвард Адельберт Дойзі та Хенрік Дам отримали Нобелівську премію за відкриття вітаміну К і його хімічної структури.[3]

1.3 Вітамін В 12 - його структура та біологічна роль

Вітамін В12 — це водорозчинний вітамін, який природним чином присутній в деяких продуктах харчування, додається до інших і доступний як дієтична добавка та ліки, що відпускаються за рецептом. Оскільки вітамін В12 містить мінерал кобальт, сполуки з активністю вітаміну В12 разом називаються кобаламінами . Метилкобаламін і 5-дезоксиаденозилкобаламін є метаболічно активними формами вітаміну В12. Однак дві інші форми, гідроксикобаламін і ціанокобаламін, стають біологічно активними після їх перетворення в метилкобаламін або 5-дезоксиаденозилкобаламін. Вітамін В12 необхідний для розвитку, мієлінізації та функціонування центральної нервової системи; формування здорових еритроцитів; та синтез ДНК . Вітамін В12 функціонує як кофактор для двох ферментів, метіонінсинтази та L-метилмалоніл-КоА мутази. Метіонінсинтаза каталізує перетворення гомоцистеїну в незамінну амінокислоту метіонін. Метіонін необхідний для утворення S-аденозилметіоніну, універсального донора метилу для майже 100 різних субстратів, включаючи ДНК, РНК, білки та ліпіди. Мутаза L-метилмалоніл-КоА перетворює L-метилмалоніл-КоА в сукциніл-КоА в процесі метаболізму пропіонату, коротколанцюгової жирної кислоти . [5]

Кількість вітаміну В12 зазвичай оцінюють шляхом вимірювання рівня вітаміну В12 у сироватці або плазмі. Гранична межа між нормальним рівнем вітаміну В12 і дефіцитом залежить від методу та лабораторії, але більшість лабораторій визначають субнормальні значення в сироватці або плазмі як такі, що нижчі за 200 або 250 пг/мл . Рівні сироваткової метилмалонової кислоти, метаболіту, пов'язаного з вітаміном В12, є найбільш чутливими маркерами

вітаміну В12, а рівень метилмалонової кислоти більше 0,271 мікромоль/л свідчить про дефіцит вітаміну В12 . Іншим маркером є загальний рівень гомоцистеїну в плазмі, який швидко зростає, коли рівень вітаміну В12 знижується; рівень гомоцистеїну в сироватці крові вище 15 мікромоль/л, свідчить про дефіцит вітаміну В12 . Рекомендації щодо споживання вітаміну В12 та інших поживних речовин наведені в Дієтичних стандартах споживання (DRIs), розроблених Радою з харчових продуктів і харчування (FNB) при Національних академіях наук, техніки та медицини. [6]

Таблиця 1.1

Рекомендовані дієтичні норми вітаміну В12 [5]

Вік	Чоловіки	Жінки	Вагітні
0–6 місяців	0,4 мкг	0,4 мкг	
7–12 місяців	0,5 мкг	0,5 мкг	
1–3 роки	0,9 мкг	0,9 мкг	
4–8 років	1,2 мкг	1,2 мкг	
9–13 років	1,8 мкг	1,8 мкг	
14+ років	2,4 мкг	2,4 мкг	2,6 мкг

1.4. Історія відкриття вітаміну B12

Дослідження вітаміну B 12 почалися в 1920-х роках у зв'язку з хворобою, вперше описаною в 1824 році, перніціозною анемією. Основними симптомами цієї хвороби були втома, втрата ваги, головні болі та, у важких випадках, деменція, втрата пам'яті, м'язова слабкість і периферична нейропатія, які можуть стати летальними без лікування. У 1926 році Майнот і Мерфі продемонстрували, що пацієнти з перніціозною анемією можуть успішно вилікуватися від цього стану за допомогою спеціальної дієти з великою кількістю злегка провареної печінки та м'язового м'яса . Вони вважали, що лікування було успішним через невідомий «зовнішній фактор», присутній у печінці тварин. [7] За це відкриття вони отримали Нобелівську премію з фізіології та медицини в 1934 році, хоча минуло більше двох десятиліть, перш ніж так званий «зовнішній фактор» був виявлений і виділений. Це сталося в 1948 році, коли дві дослідницькі групи фармацевтичних компаній (Folkers з Merck, Sharp & Dohme і Smith з Glaxo) майже одночасно виділили сполуку кобальту з печінки тварин, яка сама по собі виліковувала перніціозну анемію. Через рік цю ж сполуку можна було виділити з інших джерел, таких як молоко, яловичина та кілька бактеріальних культур. Цю червону кристалічну октаедричну сполуку кобальту назвали вітаміном B 12 . Цікаво, що роками пізніше було виявлено, що ця сполука насправді була однією з багатьох ізоформ сімейства кобаламіну (Cbl), ціанокобаламіну (CNCbl), штучної фізіологічно неактивної форми кобаламіну, утвореної в промисловому процесі екстракції та виділення з печінки. Крім того, CNCbl був першою ізоформою кобаламіну, структура якої була розкрита в 1955 році Дороті Ходжкін.

У 1957 році цією ж групою також була визначена структура аденозилкобаламіну (AdoCbl), однієї з двох активних форм кобаламіну . Ці відкриття призвели до присудження Ходжкіну Нобелівської премії з хімії в

1960 році. Через два роки була відкрита ще одна фізіологічно активна ізоформа вітаміну В₁₂, метилкобаламін (MetCbl). Було виявлено, що і AdoCbl, і MetCbl діють як кофактори в кількох ферментах, і в наступні роки було виділено та описано багато залежних від MetCbl та AdoCbl ферментів. Деякі з них, такі як метіонінсинтаза з *Escherichia coli* та L-метилмалоніл-КоА мутаза з *Propionibacterium shermanii*, були кристалізовані, а також більшість молекул, відповідальних за транспорт вітаміну В₁₂ у ссавців. [8]

У 1973 році після тривалого дослідження, яке тривало більше десяти років, Вудворд і його колеги описали повний хімічний синтез вітаміну В₁₂. Процес був складним, складався з понад 60 етапів, включаючи реакції захисту та зняття захисту, і давав дуже низький вихід, менше 1%.

Вже в 1959 році компанія Merck & Co. розпочала перше промислове виробництво вітаміну В₁₂. Цей важливий крок значно покращив доступність вітаміну В₁₂ для людей у всьому світі, що призвело до лікування перніціозної анемії та інших дефіцитних станів.

1970-ті роки стали свідками значного прогресу у виробництві вітаміну В₁₂. Розробка нових методів ферментативного виробництва дозволила зробити процес більш ефективним та економічним. Нові ферментативні методи дозволили значно скоротити час і витрати, пов'язані з виробництвом. Це стало можливим завдяки використанню ензимів, які каталізують хімічні реакції, необхідні для виробництва вітаміну В₁₂.

Впровадження нових методів мало значний вплив на доступність та ціну вітаміну В₁₂. Це зробило його більш доступним для людей у всьому світі, що призвело до покращення лікування дефіциту вітаміну В₁₂.

В 1990-ті роки розроблено генетично модифіковані мікроорганізми для виробництва вітаміну В₁₂. До розробки ГМ-мікроорганізмів виробництво вітаміну В₁₂ ґрунтувалося на природних бактеріях, здатних його виробляти. Цей процес, хоча й був покращений завдяки ферментативним методам, все ще мав певні обмеження. ГМ-мікроорганізми ж дозволили значно підвищити ефективність виробництва, що призвело до суттєвого зниження його вартості.

ГМ-мікроорганізми створюються шляхом введення генів, що відповідають за виробництво вітаміну В12, з інших організмів. Це дозволяє їм виробляти значно більше вітаміну, ніж природні бактерії. Крім того, ГМ-мікроорганізми можна оптимізувати для кращого росту та стійкості до несприятливих умов середовища, що робить виробництво ще більш ефективним.

1.5 Хімічна структура вітаміну В12

Кобаламін, або вітамін В₁₂, є найбільшим і найскладнішим з усіх типів вітамінів. Структура молекули кобаламіну проста, але містить багато різних різновидів і комплексів. Дослідження молекулярної структури вітаміну допомагає краще зрозуміти, як організм використовує вітамін В₁₂ для побудови еритроцитів і запобігання синдрому перніціозної анемії. [9]

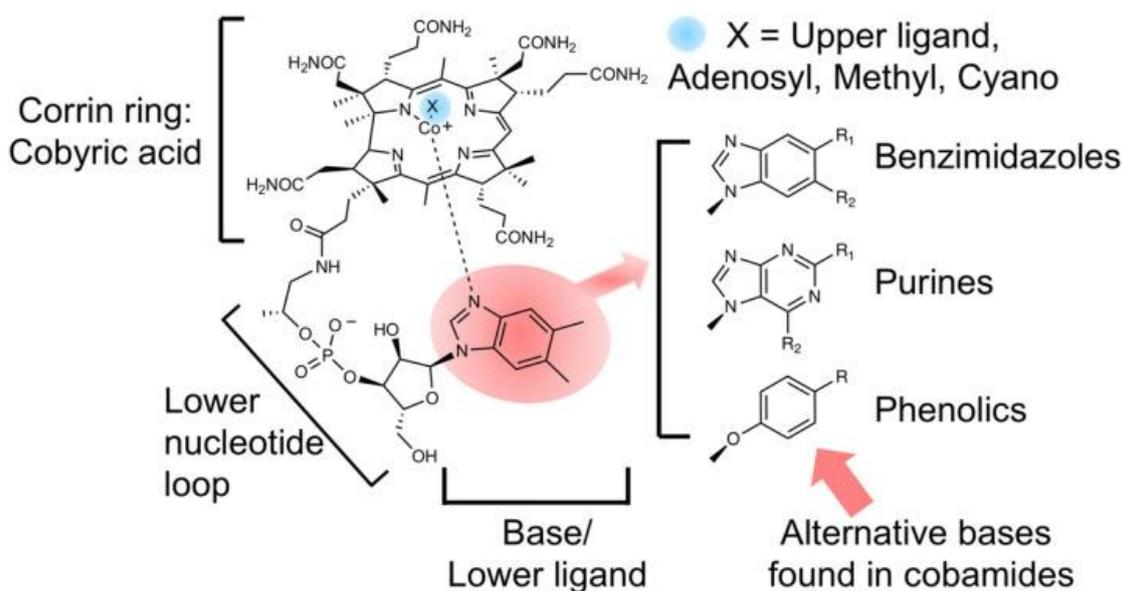


Рисунок 1 Хімічна структура вітаміну В12 [10]

Металоферментна структура кобаламіну являє собою корінове кільце з кобальтом, єдиним металом у молекулі, розташованим прямо в центрі структури і чотирма координованими зв'язками азоту з чотирьох пірольних груп. Ці чотири групи субодиниць рівномірно розділені на одній площині, прямо одна навпроти одної. Вони також з'єднані один з одним метиленовим зв'язком С-СН₃ з іншого боку, СН з одного боку та двома піролами, які безпосередньо з'єднуються. Разом вони утворюють ідеальне корінове кільце.

П'ятим лігандом, з'єднаним з кобальтом, є атом азоту, який походить від 5,6-диметилбензимидазолу. Він представляє себе як вісь, що йде прямо вниз від кобальтового кільця прямо під коріновим кільцем. Цей бензимидазол також з'єднаний із п'ятивуглецевим цукром, який згодом приєднується до фосфатної групи, а потім прикріплюється назад до решти структури. У шостій позиції над кільцем Корріна активний центр кобальту може безпосередньо з'єднуватися з кількома різними типами лігандів. Він може з'єднуватися з CN з утворенням ціанокобаламіну, з метильною групою з утворенням метилкобаламіну, з 5'-дезоксиаденозильною групою з утворенням аденозилкобаламіну та OH, гідроксикобаламіну. Кобальт завжди готовий окислюватися від $1+$ до $2+$ і $3+$, щоб з'єднатися з R-групами, які з ним з'єднані. Наприклад, гідроксокобаламін містить кобальт із зарядом $3+$, тоді як метиладенозил містить кобальт із зарядом $1+$. [10]

Конфігурація точкової групи кобаламіну - C_{4v} . Щоб визначити цю симетрію, необхідно побачити, що структура здатна обернутися чотири рази і в решті-решт повернеться у своє початкове положення. Крім того, немає площини сигма h і перпендикулярної осі C_2 . Однак, оскільки існують площини сигма v , які розрізають молекули на рівні частини, ясно визначити, що структура кобаламіну є C_{4v} . Оскільки кобальт був центральним металом молекули, кобаламін мав спотворену октаедричну конфігурацію. Вісь, яка з'єднує кобальт із 5,6-диметилбензимидазолом, розтягнута до самого дна. Його відстань у декілька разів перевищує відстань від Кобальту та приєднаної до нього групи R. Іноді це також можна назвати тетрагональною структурою. Вся форма в цілому схожа на октаедр, але дві осьові групи різні і розділені на нерівні відстані. Оскільки в системі є лише один металоферментний центр, щойно згадана точкова група та конфігурація також приписуються структурі в цілому. Оскільки структура металокоферменту розтягнута, вона досить слабо координувана і може бути розбита на частини або замінена іншими групами, як зазначено вище.[10]

1.6. Значення вітаміну В12 та хвороби викликані дефіцитом вітаміну

Ферменти кобаламіну, мають широкий спектр каталітичних можливостей, що робить їх незамінними для багатьох важливих біохімічних процесів в організмі.

Одним з цікавих прикладів їхньої роботи є реакція внутрішньомолекулярних перегрупувань. Цей тип реакції передбачає обмін двох груп, розташованих на сусідніх атомах вуглецю, з коферментом кобаламіну.

Синтез амінокислот: Деякі амінокислоти, необхідні для білкового синтезу, утворюються за допомогою реакцій внутрішньомолекулярних перегрупувань, каталізованих кобаламіновими ферментами.

Деградація жирних кислот: Кобаламінові ферменти також беруть участь у розщепленні довголанцюгових жирних кислот, що є важливим джерелом енергії для організму.

Інша реакція передбачає перенесення метильної групи в певних реакціях метилювання, таких як перетворення гомоцистеїну в метіонін, біосинтез холіну та тиміну тощо. Ці взаємодії можуть принести корисні значення біологічним тілам. [11]

Кобаламін має багато корисних властивостей . Важливість цього вітаміну полягає в його здатності підтримувати загальне здоров'я організму та сприяти утворенню ДНК та РНК. Ціанокобаламін, один з видів кобаламіну, сприяє утворенню червоних кров'яних тілець. Кобаламін також відіграє важливу роль у метаболізмі жирних кислот, необхідних для підтримки мієліну. [12]

Дослідження показали, що люди з дефіцитом вітаміну В₁₂ виявляють нерегулярне руйнування мієлінової оболонки, що призводить до паралічу та

смерті. Деякі з інших симптомів нестачі кобаламіну - це слабкий ріст, мегалобластний кістковий мозок, зміни шлунково-кишкового тракту, лейкопенія та гіперсегментовані нутрофіли. [13]

РОЗДІЛ 2

Характеристика мікроорганізмів продуцентів вітаміну B12

2.1. *Propionibacterium freudenreichii*

Propionibacterium freudenreichii — це грампозитивний молочний пробіотичний вид бактерій, який протягом тривалого часу використовувався як закваска для дозрівання у виробництві швейцарського сиру. Він використовувався для виробництва вітаміну B12 та органічних кислот, а також для оптимізації виробництва сиру, в тому числі для дозрівання та виробництва ароматичних сполук. Крім того, він з'явився в середовищі пробіотиків завдяки кільком корисним властивостям, включаючи стійкість до стресу в шлунково-кишковому тракті, адгезію до клітин господаря, антипатогенну активність, протираковий потенціал та імуномодулюючі властивості. Ці корисні властивості були підтверджені дослідженнями *in vitro* та *in vivo*. Було показано, що різноманітність усередині виду є важливим аспектом, який слід брати до уваги, оскільки багато з цих властивостей залежали від штаму. [14]

2.1.1. Систематичне положення

Царство: Bacteria

Тип: Actinomycetota

Клас: Actinomycetia

Сімейство: Propionibacteriaceae

Рід: *Propionibacterium*

Вид: *Propionibacterium freudenreichii* [15]

2.1.2. Морфологія:

- Форма: палички або коки
- Розмір: 0,5–1,0 мкм × 1,0–5,0 мкм

- Класифікація за Грамом: грампозитивний
- Рухливість: нерухомі
- Спороутворення: не спороутворюючі

2.1.3. Культуральні характеристики:

вид клітинного дихання: : факультативний анаероб

Температура росту: 30–37°C (оптимально)

pH росту: 6,0–8,0 (оптимально)

Агарові середовища:

- Середовище для росту пропіонібактерій (РПБ)
- Кров'яний агар
- Середовище Блаунта
- Середовище МакКонкі

Колонії:

- На РПБ: круглі, гладкі, білі або кремові, з характерним запахом пропіонової кислоти
- На кров'яному агарі: не гемолітичні
- На середовищі Блаунта: зелені з жовтою зоною навколо
- На середовищі МакКонкі: безбарвні [15]

2.1.4. Біохімічні характеристики:

- Каталозопозитивні
- Оксидазонегативні
- Ферментують глюкозу з утворенням пропіонової кислоти, вуглекислого газу та водню
- Не ферментують лактозу
- Продукують індол
- Відновлюють нітрати до нітритів

2.1.5. Фізіолого-біохімічні ознаки

P. freudenreichii здатний використовувати кілька джерел вуглецю (наприклад, гліцерин, еритріол, L-арабіноза, адонітол, галактоза, D-глюкоза, D-фруктоза, D-маноза, інозит, арбутин, ескулін, лактоза, лактат і глюконат) у

процесі бродіння для отримання пропіонату разом з ацетатом, сукцинатом і вуглекислим газом (CO_2). На відміну від інших видів, *propionibacterium* він здатний відновлювати піруват до пропіонату за допомогою транскарбоксилазного циклу (також відомого як цикл Вуда–Веркмана), який є циклічним процесом, поєднаним з окисним фосфорилуванням, що забезпечує більш високий вихід АТФ, ніж в інших бактеріях, що продукують пропіонат. У свою чергу, піруват є молекулою метаболічного вузла, який може бути використаний або для синтезу ацетату, що генерує НАДН, або для синтезу пропіонату, що споживає НАДН. Залежним від штаму способом бактерія модулює пропорції пірувату, які відновлюються до пропіонату або окислюються до ацетату та CO_2 , таким чином підтримуючи окисно-відновну рівновагу. [16]

Інші аспекти *P. Freudenreichii* також вивчалася стійкість до стресових умов, таких як тривалий дефіцит харчування. Скринінг проводився з вісьмома *P. Freudenreichii* штамами, які інкубували протягом кількох днів після початку стаціонарної фази, без подальшого додавання поживних речовин. Вони продемонстрували високі показники виживаності та відсутність лізису, що вказує на те, що ці штами адаптуються до тривалого дефіциту поживних речовин, використовуючи життєздатний, але некультивований стан. Штам *P. Freudenreichii* CIRM-BIA138 було додатково досліджено в цих умовах інкубації, і було показано, що висока популяція зберігається навіть після вичерпання лактату, переважного джерела вуглецю. Аналіз РНК-seq показав, що кілька метаболічних шляхів і шляхів обробки інформації були знижені. [17]

2.1.6. Поширення в природі

Шкіра людини: *P. freudenreichii* є частиною природної мікробіоти шкіри людини і відіграє роль у регулюванні рН шкіри та запобіганні росту шкідливих бактерій.

Шлунково-кишковий тракт: *P. freudenreichii* також присутня в шлунково-кишковому тракті людини, де вона може сприяти перетравленню їжі та виробництву вітамінів.

Молочні продукти: *P. freudenreichii* є однією з бактерій, які використовуються для виготовлення сиру, таких як швейцарський сир і емменталь. Бактерія надає сиру його характерний гострий смак і текстуру.

Ґрунт: *P. freudenreichii* також зустрічається в ґрунті, де вона відіграє роль у розкладанні органічних речовин. [18]

2.2. *Pseudomonas denitrificans*

Pseudomonas denitrificans - це грамнегативна, аеробна, паличкоподібна бактерія, поширена в ґрунті. Вона добре відома своєю здатністю продукувати вітамін B12, також відомий як кобаламін, і є одним з небагатьох мікроорганізмів, які можуть синтезувати його в аеробних умовах. [19]

2.2.1. Систематичне положення

Домен: Bacteria

Тип: Proteobacteria

Клас: Gammaproteobacteria

Порядок: Pseudomonadales

Родина: Pseudomonadaceae

Рід: *Pseudomonas*

Вид: *Pseudomonas denitrificans* [20]

2.2.2. Морфологія:

- Форма: Паличкоподібні клітини, які можуть бути поодинокими, парними або утворювати короткі ланцюжки.
- Розмір: Клітини мають розмір 0,6–1,0 мкм завширшки та 1,0–5,0 мкм завдовжки.
- Класифікація за Грамом: Грампозитивна
- Рухливість: Не рухомі
- Спороутворення: Не утворює спор

2.2.3. Культуральні характеристики:

Вид клітинного дихання: Факультативно анаеробне (може рости як в присутності, так і за відсутності кисню)

Температура росту: Оптимальна температура 30–37°C, може рости в діапазоні 20–50°C

pH росту: Оптимальний pH 6,5–7,5, може рости в діапазоні 5,5–8,5

Агарові середовища:

- М'ясний екстракт пептонний агар (МПА): Колонії зазвичай круглі, гладкі, непрозорі, білого або кремового кольору.
- Агар з кров'ю: Зазвичай негемолітична (не руйнує еритроцити).

2.2.4. Біохімічні характеристики:

- Ферментація: Ферментує різні вуглеводи, такі як глюкоза, сахароза та лактоза, з утворенням кислот та газів.
- Денитрифікація: Здатна перетворювати нітрати на нітрогенний газ.
- Ензими: Виробляє широкий спектр ферментів, включаючи протеази, амілази та ліпази.
- Тест на гідроліз казеїну: Позитивний (розщеплює казеїн, прояснюючи середовище навколо колонії).[21]

2.2.5. Фізіолого-біохімічні ознаки

Pseudomonas denitrificans використовує цукри як паливо за допомогою шляху Ентнера-Дудорова, де кінцевим продуктом є піруват (реакція дисиміляції). Ця конкретна реакція включає альтернативну групу ферментів, відмінних від тих, що беруть участь у гліколізі та пентозофосфатному шляху. Крім того, *Pseudomonas* демонструє цікаву властивість за умов дефіциту заліза: він виділяє піовердин (також відомий як флуоресцеїн або сидерофор), флуоресцентний жовто-зелений пігмент. Окрім цього, види *Pseudomonas denitrificans* здатні виробляти інші пігменти, такі як піоціанін, який виглядає синім.

P. denitrificans виробляє два пігменти (синій пігмент, піоціанін і жовто-зелений пігмент), а також червонуватий пігмент, відомий як піорубрин, і коричневий пігмент, який називається піомеланін. На кров'яному агарі видно гемолітичну реакцію. [22]

Однак *P. denitrificans* не демонструє ферментативний катаболізм. Деякі види, такі як *P. denitrificans*, можуть вибрати нітрат як акцептор електронів замість кисню, це передбачає зростання в анаеробних умовах, коли використовується шлях денітрифікації.

2.1.6. Поширення в природі

Ґрунт: Це найпоширеніше місце проживання *P. denitrificans*, де вона відіграє важливу роль у кругообігу азоту, перетворюючи нітрати (NO_3^-) на азотний газ (N_2), який повертається в атмосферу.

Вода: *P. denitrificans* можна знайти в прісних і солоних водах, включаючи річки, озера, ґрунтові води та морські середовища. Використовується в деяких системах очищення води для видалення нітратів з ґрунтових вод і стічних вод.

Відходи: Ця бактерія часто зустрічається в місцях з високим вмістом органічних речовин, таких як компостні купи, стічні води та очисні споруди.

Шлунково-кишковий тракт тварин: *P. denitrificans* є частиною мікробіоти кишечника багатьох тварин, де вона може сприяти травленню та імунній функції.[20]

РОЗДІЛ 3

Технологія виробництва вітаміну В12

3.1. Мікробіологічне виробництво вітаміну В 12 : аеробний і анаеробний шляхи

Відкриття структури та біологічних функцій різних сполук вітаміну В₁₂ у 1970-х роках привернуло увагу багатьох дослідників до біосинтетичних шляхів організмів, що продукують Сbl. Структурна складність, як пізніше було встановлено, була зумовлена великим і заплутаним біосинтезом. [23].

Хоча деякі проміжні продукти були знайдені та виділені раніше , лише в 1990-х роках повний біосинтетичний шлях був описаний у *Pseudomonas denitrificans* . Гени, задіяні в синтезі Сbl, отримали префікс *cob* і букву, яка відноситься до кожної позиції гена в опероні. У наступні роки проміжні продукти кобаламіну *P. denitrificans* були охарактеризовані та виділені французькою компанією Rhône-Poulenc Santé, нині Sanofi [24].

Пізніше гени, які беруть участь у біосинтезі Сbl, були охарактеризовані в інших організмах, таких як *Bacillus megaterium* , *Salmonella enterica* та раніше вивчена *Propionibacterium freudenreichii* . З самого початку було зрозуміло, що шлях, виявлений у пізніших організмах, був подібний до того, що був виявлений у *P. denitrificans*, але генетично інший. Ключові відмінності включали відсутність монооксигенази та іншої кобальтохелатази. Беручи це до уваги, було встановлено два різних шляхи біосинтезу Сbl: аеробний або пізній шлях введення кобальту, що виконується *P. denitrificans* [25].

Незалежно від шляху біосинтезу, синтез тетрапіролу починається з синтезу 5-амінолевулінової кислоти (ALA). Після цього перетворення АЛК здійснюється за допомогою трьох різних ферментативних реакцій.

По-перше, ALA-дегідратаза (EC 4.2.1.24), Zn^{2+} і Mg^{2+} -залежний фермент каталізує реакцію конденсації між двома молекулами ALA з утворенням порфобіліногену (PBG) [27]. Потім дезаміназа PBG полімеризує чотири молекули PBG у лінійний тетрапірол. Нарешті, синтаза уропорфіриногену III здатна інвертувати несиметричний ізомер гексагідропорфірину [28]. Ця молекула є останньою проміжною речовиною, спільною з іншими простетичними групами, такими як групи гему та хлорофілу.

Перетворення уропорфіриногену III в прекоррін-2, першу молекулу (Рис 3.1), каталізується метилтрансферазою уропоргіриноген III (EC 2.1.1.107), для якої потрібен S-аденозил-L-метіон (SAM) як донор метилу. Більш конкретно, фермент метилює в С-2 уропорфіриноген III, утворюючи прекоррін I, і після фототрофної таутомеризації той самий фермент здатний метилювати в С-7, отримуючи прекоррін-2, який є останнім загальним проміжним продуктом для коферменту сірогома, Р450 і вітаміну B_{12} [29,30].

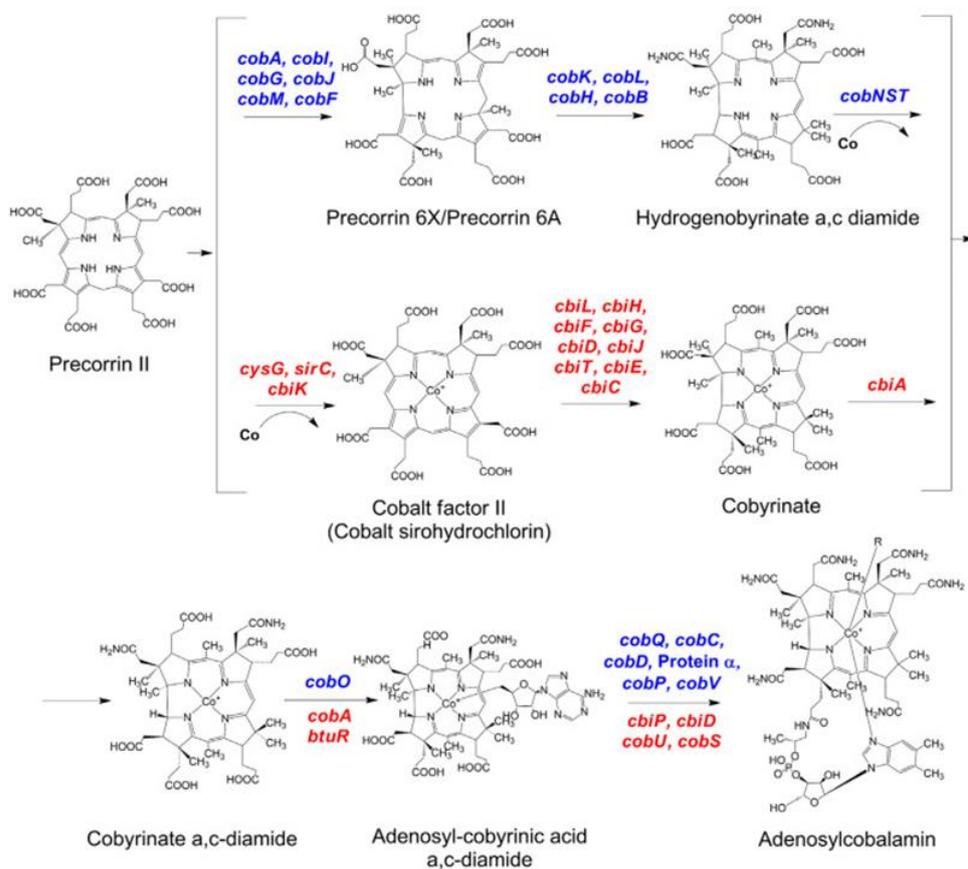


Рис 3.1 - шлях анаеробного та аеробного біосинтезу аденозилкобаламіну. Гени, що кодують білки аеробного та анаеробного шляхів, показані синім і червоним кольором відповідно, за винятком протеїну α , ген кодування якого невідомий. [31]

Основні відмінності між аеробним і анаеробним шляхами полягають у скороченні кільця та етапах хелатування кобальту (Рис 3.1). З одного боку, для скорочення кільця в аеробному шляху потрібна молекула кисню плюс монооксигеназа (CobG) для утворення прекорину-3В, гідроксильованого γ -лактонового проміжного продукту, який зазнає маскованої пінальної перегрупування під час скорочення кільця, екструбуючи метильовану позицію С20. Потім кільце повністю стискається, і в процесі вивільняється молекула оцтової кислоти. З іншого боку, скорочення кільця відбувається на більш пізній стадії анаеробного шляху, коли кобальт вже вставлено в молекулу. Цей етап каталізується ферментом, кодованим геном *cbiH*, без потреби в молекулярному кисні. Після цього SAM-залежне метилювання відбувається в С17, сприяючи екструзії вже метильованого положення С20 і утворюючи δ -лактонне кільце [32].

Хелатування кобальту також дуже відрізняється в обох шляхах. В аеробному шляху відбувається «пізніє» введення атома кобальту після повного скорочення кільця. Ця вставка каталізується АТФ-залежним мультиферментним комплексом (*cobNST*) у присутності магнію. У анаеробному шляху цей етап відбувається на більш ранній точці маршруту, коли кобальтова хелатаза, кодована або генами *cbiX*, або *cbiK*, каталізує вставку кобальту, коли кільце все ще перебуває в нескороченому стані [32].

Крім того, незалежно від шляху біосинтезу корінового кільця, DMVI виробляється окремо для подальшого приєднання в α -аксіальній конформації. Синтез нижчого ліганду був описаний нещодавно і також представляє два чітко диференційовані шляхи (аеробний та анаеробний шлях), залежно від потреб кисню.

З одного боку, аеробний біосинтез DMBI каталізується 5,6-диметилбензімідазолсинтазою BluB (EC 1.13.11.79), яка виконує фрагментацію та скорочення зв'язаного флавінового мононуклеотидного кофактора та розщеплення рибітилового хвоста з утворенням DMBI та D-еритрозо-4-фосфат у присутності молекулярного кисню. Пізніше фосфорибозилтрансфераза CobU/T (EC 2.4.2.21) вводить DMBI через реакцію нуклеофільного заміщення [33]. Цей шлях вперше був описаний для *S. meliloti*, а пізніше виявлений у більшості бактерій, що продукують Cbl [34], включаючи двох найважливіших промислових продуцентів, *P. freudenreichii* і *P. denitrificans*. Цей факт підкреслив нездатність *P. freudenreichii* повністю виробляти Cbl анаеробно без будь-якого зовнішнього додавання DMBI.

З іншого боку, анаеробний біосинтез DMBI каталізується генними продуктами оперону *bzaA-bzaB-cobT-bzaC-bzaD-bzaE*, які сприяють утворенню DMBI за допомогою 5-гідроксибензімідазолу, 5-метоксибензімідазолу та 5-метокси-6-метилбензімідазолу як проміжні продукти. Цей шлях був описаний у облигатних анаеробних бактерій *Eubacterium limosum* і *Acetobacterium woodii* [33].

3.2 Оптимізація біопроцесу для виробництва ціанокобаламіну

Попит на кобаламін у харчовій промисловості, виробництві напоїв, дієтичних і нутрицевтичних препаратів різко зріс за останні роки через підвищення обізнаності населення в цілому про здоров'я, а також зростання популярності альтернативних дієт, таких як веганські та вегетаріанські дієти. З цієї причини протягом багатьох років було докладено багато зусиль для оптимізації штаму та процесу виробництва ціанокобаламіну [23]

Крім цих AdoCbl, MetCbl і CNCbl форм кобаламіну, існує багато інших кобаламіні з різними нижніми осьовими лігандами, які діють як ключові кофактори для кориноїд-залежних ферментів, які важливі, наприклад, для мікробіоти кишечника [35, 36]. Незважаючи на їхню важливість, цей огляд

зосереджений лише на ціанокобаламіні, формі, яка може засвоюватися та використовуватися людьми і яка зараз виробляється промисловим способом.

Історично мікроорганізми, які використовувалися для виробництва кобаламіну в промислових масштабах, були штамми з високою природною продуктивністю, головним чином різними штамми *P. freudenreichii* та *P. denitrificans*.

Протягом багатьох років загальною стратегією вдосконалення цих штамів було використання методів випадкового мутагенезу для підвищення продуктивності вітаміну В₁₂ або стійкості до токсичних проміжних продуктів, присутніх у середовищах [37]. Тим не менш, надмірна експресія генів, залучених у біосинтез кобаламіну, гетерологічна експресія чужорідних генів і пригнічення [38] кількох генів також створили кращі штамми-продуценти. Крім того, варто відзначити появу нових продуктивних штамів із багатообіцяючими результатами, таких як *Acetobacter pasteurianus*, а також гетерологічну експресію біосинтетичного шляху в інших добре відомих клітинних платформах, таких як *E. coli*. Також є багато прикладів прогресу у мікробному виробництві вітаміну В₁₂ шляхом оптимізації біопроектів.

Таблиця 3.1

Найбільш релевантні інновації, здійснені на рівні біопроектів для збільшення виробництва СbI

Мікроорганізм/Штам	Основні компоненти	Де проводиться культивування мікроорганізму	Інновація	Об'єм виробництва
1	2	3	4	5
<i>B. megaterium</i> DSM 319	Середовище Левенштейна-Єнсена	Колба для струшування на 250 мл	Додавання прекурсорів і контроль рО ₂	0,21 мг/л
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> NRRL-B-4327, 3523 та NRRL-B-3524	Бульйон лактату натрію	Колба для струшування на 250 мл	Добавка аналога вітаміну В ₁₂	31 мг/л
<i>P. freudenreichii</i> CICC	Глюкоза, CSL	Біореактор із	Біореактор EBAB	58,8 мг/л

10019		перемішування м на 1,5 л	і додавання DMBI	
<i>P. freudenreichii</i> CICC 10019	Глюкоза/гліцерин, CSL	Біореактор із перемішування м на 5 л	Біореактор ЕВАВ, гліцерин як джерело вуглецю та гідролізат стебла як джерело азоту	43 мг/л

Продовження таблиці 3.1

1	2	3	4	5
<i>P. freudenreichii</i> DF13	Доповнений сироватковий пермеат	Біореактор із перемішування м на 1 л	Спільне культивування з <i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> SM39 для одночасного виробництва фолієвої кислоти та Cbl	0,75 мг/л
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> CICC 10019	Глюкоза, CSL	Ферментер на 100 л	Додавання DMBI саме за допомогою стратегії керування Ado- Cbl	39,15 мг/л
<i>P.</i> <i>freudenreichii</i> CICC100 19	Глюкоза, CSL	7 л ферментер	Порційне бродіння з мембранним розділенням	21,6 мг/л
<i>P. denitrificans</i>	Бурякова патока, сахароза, бетаїн	120 м ³ ферментер	Глюкозо- бетаїнове годування, стратегія контролю рН	214,13 мг/л
<i>P. denitrificans</i>	Глюкоза, CSL, бетаїн	120 м ³ ферментер	Стратегія поетапного контролю швидкості поглинання кисню	188 мг/л
<i>P. denitrificans</i>	Глюкоза, CSL, бетаїн	Ферментер на 50 л	Вплив питомої швидкості споживання кисню на морфологію та продукцію клітин	213,1 мг/л
	Мальтозний		Мальтозний	

<i>P. denitrificans</i>	сироп, CSL, бетаїн	120 м ³ ферментер	сироп і CSL як основні субстрати	198,27 мг/л
<i>P. denitrificans</i>	Глюкоза, CSL, бетаїн	120 м ³ ферментер	pO ₂ ступінчастий контроль	198,80 мг/л

Загалом, між різними мікроорганізмами-продуцентами можна виявити різкі відмінності у виробництві кобаламіну. У цьому сенсі об'ємна продуктивність і продуктивність, отримані з *P. denitrificans*, явно перевершують ті, що отримані з іншими продуцентами, тоді як продуктивність *P. freudenreichii* значно варіюється залежно від штамів та умов культивування.

3.3. Мікробне виробництво в *Pseudomonas denitrificans*

P. denitrificans є грамнегативною бактерією, яка використовує аеробний біосинтетичний шлях для виробництва вітаміну В₁₂. *P. denitrificans* на даний момент є основним виробником вітаміну В₁₂, який використовується промисловими виробниками, такими як Sanofi в Європі або Huarong Pharmacy Corporation в Китаї.

З одного боку, штам Sanofi спочатку був створений шляхом поєднання методів випадкового мутагенезу та молекулярної біології, і, хоча офіційна інформація про його об'ємну продукцію недоступна, але можна припустити що цей штам продукує близько 200–300 мг/л [39]. Оптимізований штам був отриманий з природного, високопродуктивного штаму, відомого як MB-580, вперше описаного та запатентованого в 1962 році (US3018225A). Протягом кількох років французька компанія Rhône-Poulenc ампліфікувала кілька генів, залучених у біосинтез вітаміну В₁₂, поки не були створені певні високопродуктивні штами — SBL27 і, зрештою, SC510 [24]. Sanofi, колишній Rhône-Poulenc, зараз є основним європейським виробником вітаміну В₁₂.

Домінуючі світові виробники вітаміну В₁₂ на ринку, однак, розташовані в Китаї та включають Північно-Китайську Фармацевтичну Компанію, Хенань Лююань Фармацевтичну Компанію, Хебей Юйсін Біо-Інжинірингову Компанію та китайську CSPC Huarong Фармацевтичну Компанію, з об'єднаними повідомляє про виробництво вітаміну В₁₂ у 2020 році приблизно 31,41 тонни та оціночну вартість 339,8 мільйонів доларів США [40]. Походження штамів, які використовуються в їх промисловому виробництві, точно невідоме, але припускається, що це аеробний штам через різні публікації дослідницьких груп, пов'язаних з Huarong Pharmaceutical Company, і останні патенти на оптимізацію біопроцесу з *P. denitrificans*, представлений у Китаї, стверджує, що об'ємне виробництво становить до 281 мг/л (див. Таблиця 3.2).

Таблиця 3.2

Основні патенти, пов'язані з виробництвом вітаміну В₁₂.

Рід	Номер заявки на патент (посилання)	Назва	Мікроорганізм/Штам	Інновація	Об'єм не виробництва	Рік
1	2	3	4	5	6	7
Propionibacterium freudenreichii	US4544633A (Прострочено)	Процес отримання вітаміну В ₁₂ методом ферментації та мікроорганізм, що продукує вітамін В ₁₂	<i>P. freudenreichii</i> (IFO 12424, IFO 12391, IFO 12426)	Створення пропіоновостійких штамів (<i>P. freudenreichii</i> FER M-86 і FERM-87) для посиленого виробництва CNCb1	15 мг/л	1983 рік
	US6492141B1 (Прострочено)	Процес виробництва вітаміну В ₁₂	<i>P. freudenreichii</i> CBS 929.97	Ефект О ₂ у виробництві під час анаеробної фази та стратегія «наповнюй і втягуй» для посиленого виробництва	19 мг/л	1999 рік

	CN20682850 9U (Активний)	Пристрій для виробництва пропіонової кислоти та спільного виробництва вітаміну В ₁₂ шляхом напівбезперервної ферментації	P. freudenreichii	Однчасне виробництво пропіонової кислоти та вітаміну В ₁₂ у напівбезперервній ферментації з відділенням пропіонової кислоти	20,12 мг/л	2017 рік

Продовження таблиці 3.2

1	2	3	4	5	6	7
Propionibacterium freudenreichii	US9938554 (Активний)	Спільне культивування Pr opionibacterium і дріжджів.	P. freudenreichii (ATCC 6207) і дріжджові клітини (DSM 28271)	Спільне культивування P. freudenreichii і пропіонової дріжджів для зменшення хімічного кисневого навантаження відпрацьованих середовищ	16 мг/л	2018 рік
	IN201827044 769 A (Активний)	Безперервний процес спільного виробництва вітаміну В ₁₂ і органічних кислот	P. freudenreichii (ATCC 13673)	Спільне виробництво вітаміну В ₁₂ і органічних кислот у безперервній ферментації в одному біореакторі	76,13 мг/л	2020 рік
Pseudomonas denitrificans	US3018225A (Прострочен о)	Вироблення вітаміну В ₁₂	P. denitrificans MB-580	Процес отримання вітаміну В ₁₂ з високоврожайним штамом (P. denitrificans MB- 580)	2,4 мг/л	1962 рік
	US20060019 352A1	Методи підвищення	P. denitrificans	Надмірна експресія кількох	65 мг/л	1990 рік

	(Покинуто)	продукції кобаламінів за допомогою експресії гена <i>cob</i>		генів, які беруть участь у біосинтезі <i>Cob</i> ; генерація кількох надпродукуючих штамів, таких як SC-510		
	CN10153859 9A (Активний)	Спосіб підвищення виходу денітрифікованого синьогнійного вітаміну B_{12}	<i>P. denitrificans</i> J741	Збільште виробництво качанів шляхом оптимізації додавання бетаїну	177,4 9 мг/л	2008 рік
	CN10202121 4A (Активний)	Процес виробництва вітаміну B_{12} на основі споживання O_2	<i>P. denitrificans</i>	Оптимізація виробництва вітаміну B_{12} за допомогою стратегії контролю кисню	171,4 мг/л	2011 рік

Продовження таблиці 3.2

1	2	3	4	5	6	7
Pseudomonas denitrificans	CN10891373 9A (Активний)	Спосіб отримання вітаміну B_{12} з використанням <i>P. denitrificans</i> на основі контролю значення рН	<i>P. denitrificans</i>	Покращене виробництво вітаміну B_{12} шляхом оптимізації біопроцесу шляхом контролю значення рН	248 мг/л	2018 рік
	CN10983732 0A (Активний)	Спосіб сприяння <i>P. denitrificans</i> генерувати вітамін B_{12}	<i>P. denitrificans</i>	Оптимізація середовищ і умов культивування для покращення виробництва вітаміну B_{12}	198 мг/л	2019 рік
	CN11125417 3A (Активний)	Метод скринінгу культурального середовища та штамів бактерій для високого виходу вітаміну B_{12} , отриманого ферментацією з <i>P. denitrificans</i>	Кілька високопродуктивних штамів <i>P. denitrificans</i>	Скринінг штамів <i>P. denitrificans</i> , що продукують високий вміст вітаміну B_{12} , і скринінг культурального середовища	281 мг/л	2020 рік

Крім генетичних модифікацій, підвищення продуктивності вітаміну B_{12} у *P. denitrificans* також було досягнуто за допомогою оптимізації культуральних середовищ і змін умов біообробки. Наприклад, було перевірено

вплив мікроелементів у середовищі, рН, контроль розчиненого кисню та додавання кількох добавок. У цьому сенсі повідомляється, що додавання Zn^{2+} має значний позитивний вплив на синтез ALA і PBG, двох основних попередників кобаламіну, тоді як додавання Co^{2+} і DMBI, позитивно впливає на виробництво. Оптимізація початкових кількостей цих трьох сполук шляхом планування експериментів призвела до збільшення виробництва кобаламіну на 13% [41].

Склад середовищ впливав на стабільність рН культур і показав значний вплив на продукцію вітамінів. Щоб краще контролювати рН, була розроблена стратегія живлення з глюкозою як джерелом вуглецю та бетаїном як донором метилу, яка виявилася корисною для виробництва вітамінів при застосуванні до 120 м³ біореактора. Крім того, хоча добре відомо, що бетаїн діє як донор метилу для біосинтезу вітаміну В₁₂ і посилює утворення кількох ключових проміжних продуктів, таких як ALA, глутамат, гліцин і метіонін, високі концентрації бетаїну також можуть пригнічують ріст клітин. Таким чином, правильна стратегія годування бетаїном була додатково розроблена, щоб збалансувати негативний вплив на ріст клітин і позитивний вплив на виробництво кобаламіну, і пізніше була успішно реалізована в промислових масштабах [42].

Швидкість передачі кисню (OTR) також була основним предметом оптимізації біопроектів у *P. denitrificans*. Вищі OTR на початкових стадіях культивування посилюють ріст клітин, тоді як нижчі OTR на пізніх стадіях виявилися критичними для вищої продуктивності. Пізніші дослідження показали, що підвищена продукція, яка спостерігається в умовах нижчої оксигенації, може бути пов'язана зі змінами в морфології клітин, стимулюючи перехід від фази росту клітин до стану подовження, який представляє більшу продукцію вітаміну В₁₂. Беручи це до уваги, було розроблено декілька багатоступеневих стратегій контролю розчиненого кисню, у яких аерація та перемішування поступово зменшувалися, доки значення розчиненого кисню не впали нижче 2%, отримуючи покращення у виробництві приблизно на 17%

[43]. Крім того, додавання інгібіторів дихального ланцюга, таких як ротенон, також може посилити вироблення вітамінів, незважаючи на шкідливий вплив на ріст клітин [44].

Різні джерела вуглецю та азоту, такі як глюкоза, мальтозний сироп, бурякова патока та кукурудзяний напій, були перевірені як дешевші альтернативи дорожчій очищеній сахарозі та глюкозі. Деякі з цих сполук можуть негативно вплинути на стабільність рН і, отже, на кінцеве виробництво вітамінів. Тим не менш, поєднання мальтозного сиропу, кукурудзяного розчину та бетаїну було визнано успішною та дешевшою альтернативою традиційним композиціям середовищ [39].

3.4. Мікробне виробництво в *Propionibacterium freudenreichii*

Штами *P. freudenreichii* містять грампозитивні паличкоподібні бактерії, названі на честь їхньої здатності синтезувати великі кількості пропіонової кислоти шляхом Вуда–Веркмана.

Деякі підходи генної інженерії були перевірені на *P. freudenreichii* для отримання більшої кількості вітаміну B_{12} . Наприклад, повідомляється, що надмірна експресія деяких основних генів, залучених до синтезу кобаламіну, і підхід перетасування генома покращують виробництво кобаламіну. Однак основні промислові штами зазвичай отримували шляхом випадкового мутагенезу з використанням різних мутагенних агентів, таких як ультрафіолетове світло або хімічні сполуки, для отримання кращих продуцентів кобаламіну. У *P. freudenreichii* ці високопродуктивні штами зазвичай демонструють вищу толерантність і стійкість до пропіонової кислоти [37].

P. freudenreichii є факультативними анаеробними штамами, які дотримуються анаеробного біосинтетичного шляху для виробництва кобаламіну. Незважаючи на те, що вони виробляють високі виходи кобаламіну лише в умовах дуже низького вмісту кисню, кисень необхідний для синтезу DMBI та його приєднання до корінового кільця [45]. З цієї причини

культивування зазвичай поділяють на дві стадії: першу стадію, на якій клітини культивують у повністю анаеробних умовах, і другу стадію, як правило, після 72–96 год культивування, на якій м'яка аерація забезпечується перемішуванням для створення мікроаерації, необхідної для синтезу DMBI та виробництва кобаламіну [46].

Ці бактерії мають здатність виробляти велику кількість пропіонової кислоти, яка з часом стає токсичною та обмежує ріст клітин [47]. Таким чином, було випробувано кілька стратегій оптимізації біопроектів для зменшення накопичення пропіону. Зокрема, методи видалення продукту *in situ* (ISPR) показали багатообіцяючі результати для одночасного виробництва пропіонової кислоти та вітаміну B₁₂. Серед методів ISPR було повідомлено, що використання адсорбційних біореакторів з розширеним шаром (EBAB) зі смолами високої біосумісності, такими як ZGA330, підтримує об'ємні рівні виробництва вітаміну B₁₂ від 40 мг/л до 60 мг/л [47]. У EBABs адсорбція відбувається, коли колонка розширюється, що дозволяє культурі проходити через хроматографічну колонку без забивання, тоді як пропіонова кислота утримується в смолі. Різні умови культивування, джерела вуглецю та азоту і додавання добавок середовищ, таких як DMBI, були перевірені для одночасного покращення виробництва пропіонової кислоти та вітаміну B₁₂. У системі EBAB комбінація глюкози та гліцерину [48] і гідросилати стебла кукурудзи виявилися ефективними джерелами вуглецю, із заявленими об'ємними рівнями виробництва CNCbl 43,2 мг/л та 47,6 мг/л відповідно.

Добавки попередників кобаламіну є ще однією поширеною стратегією підвищення продуктивності. Додавання звичайних прекурсорів і необхідних сполук, таких як ALA і Co²⁺, часто описується як корисне для виробництва вітамінів [23]. Хоча всі штами *P. freudenreichii* здатні самостійно синтезувати DMBI, біосинтез цієї основи низький. Крім того, утворення DMBI неможливе в строго анаеробних умовах, оскільки для його синтезу необхідний кисень [49]. Якщо доступність DMBI обмежена, активна форма вітаміну B₁₂ не утворюється, і клітини починають накопичувати неповні форми, такі як

кобінамід або псевдовітамін В₁₂. Таким чином, додавання DMBI або навіть попередників DMBI, таких як рибофлавін або нікотіамід, постійно повідомлялося як позитивний фактор у виробництві кобаламіну [23]. Крім того, інші групи виявили, що додавання аналогів вітаміну В₁₂ може зменшити інгібування зворотного зв'язку та збільшити вироблення кобаламіну [50].

Нарешті, культури *P. freudenreichii* також цікаві в промислових умовах через їх здатність рости в широкому діапазоні складних джерел вуглецю та азоту та навіть у відходах і використаних середовищах, таких як патока , неочищений гліцерин , відходи смаження соняшнику. олія, томатні вичавки , рідкий кислий білковий залишок соєвих бобів і відпрацьоване середовище овочевого соку .

3.5. Стратегії подальшої обробки та постмодифікації вітаміну В₁₂

Відновлення вітаміну В₁₂ є добре описаним процесом, і, наскільки відомо авторам, він залишався незмінним протягом останніх десятиліть у промислових масштабах (див. рисунок 3 для класичної схеми біопроцесу). Коротко кажучи, культуральний бульйон піддається декільком стадіям розділення та очищення (включно з процесами екстракції, фільтрації та адсорбції), які впливають на загальний вихід процесу та його здійсненність. Класична подальша обробка починається з концентрації біомаси для значного зменшення об'єму, що зазвичай виконується шляхом центрифугування. Тим не менш, залежно від біопроцесу, СbI також можна знайти позаклітинно, тому очищення може починатися з цільного бульйону.

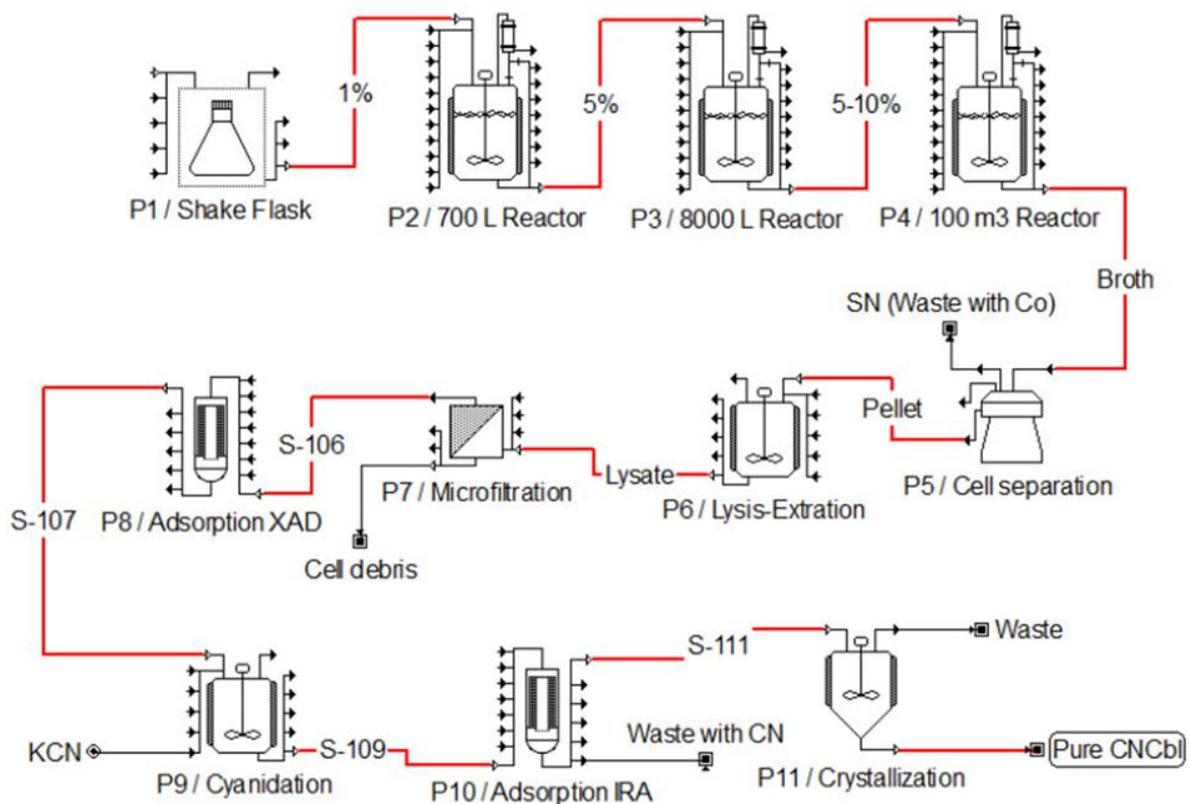


Рис 3.2 Класичний біопроект для отримання високочистого ціанокобаламіну. Основний потік CNCbl виділено червоним. Посудини для проміжного зберігання опущені для спрощення малюнка. P1-P11 представляють процеси 1-11 відповідно. Біопроект, представлений за допомогою SuperPro Designer V9 Academic Site Edition, Intelligen, Inc. (Scotch Plains, NJ, USA).[31]

У будь-якому випадку, всі види кориноїдів екстрагуються нагріванням при 80–120 °C і рН 6,5–8,5 протягом 10–30 хв. Ціанідування можна проводити під час процесу екстракції або після початкових етапів фільтрації та адсорбції. В обох випадках різні кориноїди перетворюються на кобаламін шляхом додавання ціаніду або тіоціанату калію. Цей процес зазвичай виконується в присутності нітриту натрію та тепла [45].

Пізніше розчин кобаламіну очищається за допомогою одного або кількох процесів фільтрації (мікрофільтрації та/або нанофільтрації) та адсорбції (Адсорбент Amberlite XAD-4 Thermo Fisher Scientific). Якщо вироблений Cbl направляють на корм тваринам, розчин вітаміну часто обробляють хлоридом цинку та осаджують органічними розчинниками, такими як ацетон, для отримання кінцевого продукту [51]. Коли потрібна більша чистота, наприклад, для фармацевтичних цілей, для отримання чистого кінцевого продукту часто необхідні подальші етапи адсорбції різними смолами (наприклад, IRA, оксид алюмінію), рисунок 3 являє собою класичний біопроцес для отримання високочистого CNCbl.

Після очищення вітамін B₁₂ може піддаватися різним постмодифікаціям для використання як харчова добавка або пероральний фармацевтичний засіб для підвищення його біодоступності. Захист цих сполук може бути особливо цікавим у випадках нефункціонального внутрішнього фактора, який викликає дуже низьку біодоступність CNCbl [52]. У цьому сенсі було розроблено кілька методів для захисту пероральних добавок від специфічних умов, що виникають у шлунково-кишковому середовищі. Серед них мікрокапсулювання, яке вже широко використовується у фармацевтичній та косметичній промисловості, показало, що покращує стабільність вітаміну B₁₂ за допомогою харчових емульсій, ліпосом або різних харчових інкапсулюючих агентів, такі як хітозан, аравійська камедь, альгінат натрію, карагенан, мальтодекстрин, модифікований крохмаль, ціанобактеріальний позаклітинний полімер, ксантан і пектин [53].

Крім того, Fidaleo та його співробітники нещодавно розглянули

використання наноносіїв як багатообіцяючу нанотехнологію, яка може дозволити покращити терапію вітаміном В₁₂, зменшивши побічні ефекти та загальні витрати, а також покращивши якість життя пацієнтів [53].

РОЗДІЛ 4

Економічна характеристика світового ринку виробництва кобаламіну

4.1 Світовий ринок кобаламіну

Очікується, що обсяг світового ринку вітаміну В₁₂ досягне 266,9 мільйонів доларів США у 2021 році та зареєструє CAGR доходу 7,0% протягом прогнозованого періоду. Очікується, що підвищення обізнаності людей щодо здоров'я, тенденції здорового способу життя, дефіцит вітамінів серед людей із країн, що розвиваються, зростання попиту на нутрицевтику та дієтичні добавки, а також зростання кількості веганів сприятимуть зростанню доходів ринку. Згідно з дослідженням, популяція веганів зросла на 100 000 з 2020 року, що майже вдвічі перевищує популяцію веганів у 2019 році. Очікується, що до кінця 2022 року ця кількість перевищить 2 мільйони, і очікується, що споживання ними дієтичних добавок стимулюватиме попит на різні харчові продукти на основі вітаміну В₁₂. Вітамін В₁₂, також відомий як кобаламін, перетворює вуглеводи на глюкозу та виробляє енергію, утворює еритроцити та запобігає анемії, серйозним вродженим дефектам і остеопорозу. Очікується, біодобавки з вітаміном В₁₂ підтримують здоров'я кісток і впливають на

депресію, запобігають втраті нейронів, сприятиме зростанню доходів ринку в усьому світі. Однак обмеження в ланцюзі постачання, зростання витрат через інфляцію та посилення конкурентної поведінки серед продавців обмежують розвиток нових продуктів на ринку.[54]

Споживачі з країн, що розвиваються, таких як Індія та Китай, за прогнозами, сприятимуть зростанню доходів на ринку вітаміну В12 протягом прогнозованого періоду. Наразі, згідно з дослідженням у 2020 році, близько 47% загального населення Північної Індії стикається з проблемами здоров'я через дефіцит вітаміну, а 70% дорослих і 80% дітей дошкільного віку стикаються з дефіцитом вітаміну В12. Зростання захворюваності на перніціозну анемію серед осіб у США та європейців оцінюється в 151 на 100 000, переважно у жінок через дефіцит вітаміну В12, який, як очікується, стимулюватиме попит на вітамінні добавки та дієтичні продукти.

13 квітня 2021 року Life Extension випустила В12 Elite для підтримки здоров'я мозку на клітинному рівні шляхом доставки двох різних засвоєваних форм вітаміну В12. Віковий дефіцит вітамінів можна зменшити за допомогою цієї дієтичної добавки на ринку. Згідно з дослідженням в Італії, приблизно вісім людей з 10 регулярно приймають дієтичні добавки та вітаміни, що позитивно вплинуло на зростання цього ринку на 28% за останні два роки в Італії. Зростаючі витрати на медичні заклади спонукають людей залишатися у формі та активними, приймаючи вітаміни та інші мінерали, що, як очікується, сприятиме стабільному зростанню доходів ринку вітаміну В12.

4.2.Динаміка ринку

Зростання захворюваності на дефіцит вітаміну В12 серед осіб у різних країнах серед різних вікових груп сприяє зростанню попиту на дієтичні добавки та інші вітамінні продукти. Особам старшої вікової групи з целиакією та хворобою Крона можна призначати регулярний прийом добавок вітаміну В12. Крім мієлінізації, розвитку та функціонування центральної нервової системи,

утворення еритроцитів і регуляції обміну речовин, цей водорозчинний вітамін може лікувати анемію у жінок у віці.

Крім того, недостатнє споживання вітаміну B12 може стати серйозною загрозою для населення всього світу, особливо для дітей і вагітних жінок у країнах з низьким рівнем доходу. Вітамін B12 допомагає в гормонах, ферментах та інших речовинах, які необхідні для людського організму. Дефіцит вітаміну B12 спричиняє недоїдання, що може призвести до неінфекційних захворювань, пов'язаних з дієтою, ожиріння, недостатню та надмірну вагу.

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), у 2020 році 1,9 мільярда дорослих мають надлишкову вагу або ожиріння, а 462 мільйони мають недостатню вагу. ВООЗ також заявила, що приблизно 45% смертей трапляється серед дітей віком до п'яти років через недоїдання переважно в країнах з низьким і середнім рівнем доходу. За даними ВООЗ, у 2020 році 38,9 мільйона дітей мали надмірну вагу або ожиріння. Ці фактори сприяють зростанню доходів ринку.[54]

17 травня 2022 року Performance Drink Group, оголосила про запуск Pro Boost, нового енергетичного напою без додавання цукру, без консервантів, без глютену та з нульовим вмістом калорій, як спортивне харчування та енергетичний напій, який містить яблучну кислоту, таурин, n-ацетил l-тирозин, кофеїн, l-фенілаланін і глюкуронолактон. Крім того, 8333% щоденної рекомендованої норми вітаміну B12, 2000% вітаміну B6 і 100% фолієвої кислоти, а також ніацин роблять цей енергетичний напій ефективним для споживачів, що, як очікується, сприятиме зростанню доходів ринку вітаміну B12.[54]

Очікується, що підвищення психічної вразливості людей похилого віку після спалаху COVID-19 спричинить попит на добавки з вітаміном B12 серед споживачів старших вікових груп. Лікарі призначають регулярний прийом добавок вітаміну B12 хворим на рак, вагітним жінкам, ВІЛ-інфікованим та іншим захворюванням для зміцнення імунної системи. Наявність вітаміну B12

у різних продуктах харчування та фармацевтичних продуктах підвищує поживні переваги цих продуктів серед споживачів, які споживають його регулярно.

4.3. Криза ланцюга поставок на світовому ринку

Криза COVID-19 впливає не лише на здоров'я, але й на нестачу робочої сили, сировини та контейнерів, що може вплинути на рівновагу попиту та пропозиції на ринку. Згідно з дослідженням, 24 січня 2022 року криза ланцюга постачання вплинула на індустрію харчування, включаючи ринок вітаміну B12 у всьому світі через інфляцію та обмеження ланцюга постачання. Глобальні дисбаланси, заходи з контролю над енергією та перебої в ланцюжку постачання в Китаї через випадки COVID-19 перешкоджають процесу постачання та впливають на ринок вітаміну B12. Вищі витрати на доставку збільшують витрати на виробництво добавок на основі вітаміну B12 на ринку. Крім того, за даними Індійського економічного огляду 2021 року, в Індії фармацевтична промисловість зросла на 17,7% з 13,7% у 2020 році, що зробило ринок харчування більш конкурентоспроможним і підкреслило важливість розробки нових продуктів на ринку.[54]

4.3. Статистика продажу вітаміну B 12 в залежності від форми випуску

Залежно від форми ринок вітаміну B12 поділяється на порошки, рідини, капсули та таблетки. У 2021 році сегмент порошків приніс найбільшу частку доходу. Багато споживачів, які не можуть засвоювати вітамін B12 із природних джерел, таких як продукти тваринного походження, включаючи нирки тварин, печінку, молюски, сардини, яловичину та рослинні продукти, такі як збагачені пластівці, збагачені харчові дріжджі, тунець, лосось, форель, немолочне молоко, молочні продукти, яйця та багато іншого потребують споживання дієтичних добавок та харчових продуктів у різних формах. Порошок широко використовується, оскільки його властивість розчиняти у воді, а також здатність сприяти вирішенню різних проблем зі здоров'ям, таким як зменшення

втоми та стомлюваності, утворення червоних кров'яних тілець і вирішення дефіциту засвоєння В12, який впливає на травну систему. Дієтичні добавки у вигляді порошку можуть використовуватися в дієтичних продуктах, продуктах харчування, молочних продуктах, напоях та багато іншого, що збільшує зростання доходів сегменту. Різноманітні переваги для здоров'я спонукають фітнес-тренерів, спортсменів і бодібілдерів вживати БАД у формі порошку, що підвищує попит на такі продукти.[54]

Очікується, що рідкий сегмент зареєструє помірні темпи зростання доходів протягом прогнозованого періоду, оскільки це широко використовувана форма вітаміну В12. Порівняно з таблетками та капсулами ця рідка форма потребує менше часу для початку утворення нових еритроцитів в організмі. Рідка форма може легко засвоюватися організмом і використовуватися в різних продуктах харчування та фармацевтичних продуктах для регулярного споживання, що, як очікується, сприятиме зростанню вітаміну В12 у рідкій формі.[54]

Існує підвищений попит на капсули вітаміну В12 серед людей похилого віку та споживачів, які піклуються про здоров'я, для регулярного прийому. Ці добавки лікарі призначають онкохворим і пацієнтам з дефіцитом вітамінів. PhenGold, PrimeShred, Leanbean і PhenQ — компанії, які виробляють таблетки для прискорення обміну речовин і схуднення за допомогою вітаміну В12. Очікується, що тенденція до регулярного споживання капсул вітаміну В12 сприятиме зростанню доходів цього сегменту в усьому світі.

ВИСНОВКИ

1. В даній роботі представлено опис Вітаміну В12, відомого як ціанокобаламін, що належить до родини сполук кобаламіну, його склад як однієї з найскладніших неполімерних біологічних молекул.

2. Наведено опис синтезу вітаміну В12 мікроорганізмами, такими як *Pseudomonas denitrificans*, *Propionibacterium freudenreichii* і *Bacillus megaterium*, *Sinorhizobium meliloti*. Встановлено, що більшість мікроорганізмів виробляють вітамін В 12 в анаеробних умовах, тоді як *P. denitrificans* виробляє В 12 в аеробних умовах. *P. denitrificans* використовувався виключно для промислового виробництва цього вітаміну.

Крім штамів *Pseudomonas denitrificans* і *Propionibacterium freudenreichii*, інші можливі продуценти, такі як *Sinorhizobium meliloti*, різні штами *Lactobacillus* і навіть *E. coli* (шляхом гетерологічної експресії біосинтетичного шляху), також були широко вивчені. Поки що їхня зареєстрована продукція неконкурентоспроможна, що робить її непридатною альтернативою для промислового виробництва CNCbl.

3. Представлено сучасний стан виробництва CNCbl. Наведена схема класичного біопроесу для отримання високочистого ціанокобаламіну. Саме виробництво є неоптимальним і має багато проблем, які необхідно подолати для подальшого розвитку свого потенціалу як економічно ефективного та цінного промислового біопроесу. Основна перешкода полягає в тому, що навіть у високопродуктивних аеробних штамів, таких як *Pseudomonas denitrificans*, об'ємні рівні виробництва часто становлять близько 200–300 мг/л, що є набагато нижчим, ніж рівень, отриманий за допомогою аналогічних процесів бродіння, таких як для вітаміну B₁₂. Крім того, цикли бродіння є тривалими та дорогими, головним чином через потребу в дорогих сполуках середовищ, таких як високі концентрації складних джерел азоту та добавки, такі як бетаїн. Постачання достатньої кількості кобальту в бульйон також може бути проблематичним з точки зору вартості та екології.

4. Запропоновано можливий шлях оптимізації процесу. Слід докладати подальших зусиль щодо біообробки, подальша обробки та оптимізації складу середовищ (з дешевшими або переробленими сполуками), щоб підвищити економічну життєздатність та екологічну стійкість біотехнологічного виробництва вітаміну B₁₂. Однак основною проблемою все ще є низька продуктивність доступних штамів-продуцентів, спричинена головним чином жорсткою генетичною регуляцією продукції Cbl: інгібуванням *cysG* і оперона *cbl* кобаламіну, а також іншими процесами, що знижують регуляцію. Для подолання цього обмеження може знадобитися генна інженерія, яка може бути погано сприйнята кінцевими споживачами, переважно веганами або вегетаріанцями, які дуже стурбовані своїм вибором дієти та використанням ГМО організмів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- Lieberman S and Bruning N (1990), The Real Vitamin and Mineral Book, Avery Group, 3, NY
1. Джилл Джин. Вітаміни та мінерали для профілактики серцево-судинних захворювань і раку. Журнал Американської медичної асоціації, 2022 р
 2. Piro A, Tagarelli G, Lagonia P, Tagarelli A, Quattrone A. Casimir Funk: Відкриття вітамінів і розладів їх дефіциту. Ann Nutr Metab. 2010;57(2):85-8.
 3. Річард Д. Семба . Відкриття вітамінів. Опубліковано 24 червня 2013 р. 82 (5): 310-5.
 4. Інститут медицини, ради харчових продуктів і харчування. Довідкові норми споживання тіаміну, рибофлавіну, ніацину, вітаміну В(6), фолієвої кислоти, вітаміну В(12), пантотенової кислоти, біотину та холіну. Вашингтон, округ Колумбія: National Academies Press; 1998 рік.
 5. Allen LH, Miller JW, de Groot L, Rosenberg IH, Smith AD, Refsum H, et al. Біомаркери харчування для розвитку (BOND): огляд вітаміну В-12. J Nutr 2018;

6. Майнот Г.Р., Мерфі В.П. Лікування перніціозної анемії за допомогою спеціальної дієти. 1926 рік;
7. Гарсія Байона, Л., Грахалес, А., Карденас, М.Е., Сьєрра, Р., Лозано, Г., Гаравіто, М.Ф., Рестрепо, С. Виділення та характеристика двох штамів *Fusarium oxysporum*, що викликають суху гниль картоплі в *Solanum tuberosum* у Колумбії. Іbero-американський журнал мікології, 2011р. 28 (4), ст. 166–172.
8. D.C. Hodgkin, J. Kamper, M. Maskay, J. Pickworth, K.N. Trueblood, J.G. White Structure of vitamin B12 *Nature*, 178 (4524) (1956),. ст. 64-66
9. Діна Осман , Кук А. , Уоррен М. Потреба в кобальті у вітаміні В12: парадигма металізації білка. *Biochimica et biophysica acta* 20 жовтня 2020 р.
10. J.H. Martens, H. Barg, M.J. Warren, D. Jahn Microbial production of vitamin B12 *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, ст. 275-285
11. Федосов С.Н., Федосова Н.У., Крейтлер Б., Нексо Е., Петерсен Т.Є. Механізми розрізнення кобаламінів та їх природних аналогів при їх зв'язуванні зі специфічними В12-транспортними білками. *Біохімія*. 2007 29 травня; 46 (21): ст. 46-58.
12. Wolffenbuttel BHR, Wouters HJCM, Heiner-Fokkema MR, van der Klauw MM. Багатогранність дефіциту кобаламіну (вітаміну В₁₂). *Mayo Clin Proc Innov Qual Outcomes*. Червень 2019 р.; 3 (2): 200-214.
13. Stabler SP, Allen RH. Дефіцит вітаміну В12 як світова проблема. *Annual Review of Nutrition*. 2004; ст. 299-326.
14. Patrick S, McDowell A: Family I. Propionibacteriaceae. In: Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J, Trujillo ME, Suzuki K-I, Ludwig W, Whitman WB, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume Five: The Actinobacteria*, Part B. 2nd ed. New York: Springer; 2012. p. 1138–86
15. Allen LH. Vitamin B12. In: Coates PM, Betz JM, Blackman MR, et al., eds. *Encyclopedia of Dietary Supplements*. 2nd ed. London and New York: Informa Healthcare; 2010.
16. Rabah H, Rosa do Carmo F, Jan G. Dairy Propionibacteria: Versatile Probiotics. *Microorganisms* 2017; 5: 24

17. Ojala T, Laine PKS, Ahlroos T, et al. Functional genomics provides insights into the role of *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS in cheese ripening. *Int J Food Microbiol* 2017; ст. 39-48
18. Douillard FP, de Vos WM. Biotechnology of health-promoting bacteria. *Biotechnology Advances*; 37. Epub ahead of print 1 November 2019.
19. Ainala, S. K., Somasundar, A., & Park, S. (2013). Complete Genome Sequence of *Pseudomonas denitrificans* ATCC 13867. *Genome Announcements*.
20. Фанг Х., Кан Дж. і Чжан Д. (2017). Мікробне виробництво вітаміну В12: огляд і майбутні перспективи. *Фабрики мікробних клітин*.
21. Allen LH. Vitamin B-12. *Adv Nutr* 2012;3: ст. 54-5.
22. Мартенс Х., Барг М., Воррен Д., Джа Дж.-Х. Мікробне виробництво вітаміну В 12 . *апл. мікробіол. Біотехнологія*. 2002 рік; 58 :275–285.
23. Crouzet J., Cauchois L., Blanche F., Debussche L., Thibaut D., Rouyez MC, Rigault S., Mayaux JF, Cameron B. Нуклеотидна послідовність фрагмента ДНК *Pseudomonas Dentrificans* розміром 5,4 кілооснови, що містить п'ять генів *Cob* та ідентифікація структурних генів, які кодують S-аденозил-L-метіонін: уропорфіриноген III метилтрансфераза та α , ϵ -діамідсинтаза кобрінової кислоти. 1990 рік; 172 :5968–5979
24. Thibaut D., Blanche F., Cameron B., Crouzet J., Debussche L., Remy E., Vuilhorgne M. Біосинтез вітаміну В 12 у *Pseudomonas denitrificans*. Німеччина: 1998. С. 63–79.
25. Джаффе Е. К. Сімейство металоферментів порфобіліногенсинтази. *Acta Crystallogr. секта D Biol. Кристалологр*. 2000; 56 :115–128.
26. Джаффе Е. К. Сімейство металоферментів порфобіліногенсинтази. *Acta Crystallogr. секта D Biol. Кристалологр*. 2000; 56 :115–128.
27. Jordan PM Біосинтез 5-амінолевулінової кислоти та її перетворення в уропорфіриноген III. У: Кребс Дж., Міхалак М., редактори. *Нова комплексна біохімія*. Том 19. Elsevier; Амстердам, Нідерланди: 1991. С. 1–66.
28. Раукс Е., Шуберт Х.Л., Уоррен М.Дж. Біосинтез кобаламіну (вітамін В 12): бактеріальна загадка. *Стільниковий. мол. Life Sci*. 2000; 57 :1880–1893.

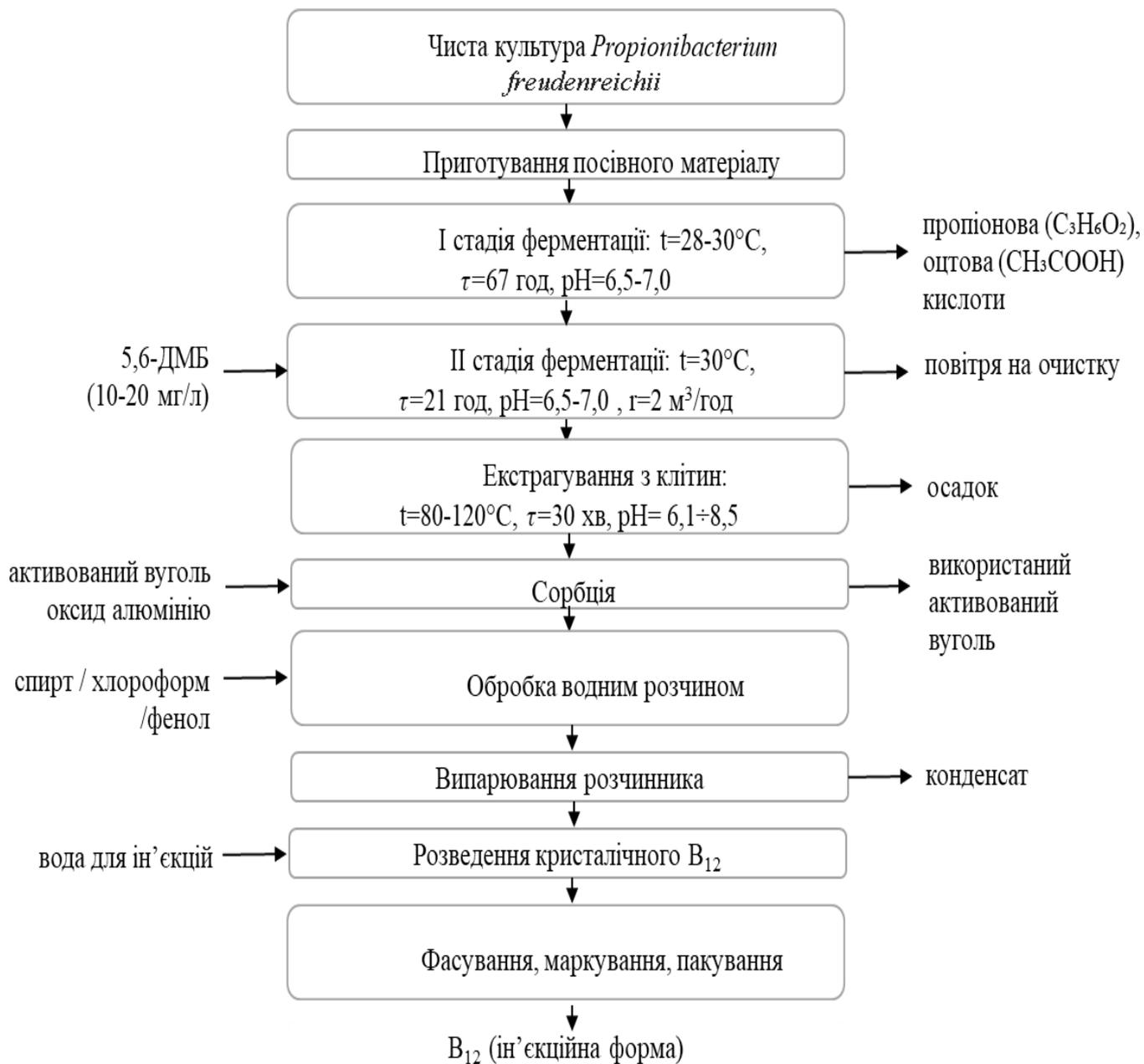
29. Warren MJ, Raux E., Schubert HL, Escalante-Semerena JC Біосинтез аденозилкобаламіну (вітамін В 12) Nat. Виробник Rep. 2002; 19 :390–412.
30. Альваро Кальвільо, Тереза Пеллісер, Марк Карнісер, Антоні Планас. Стратегії біопроцесу для виробництва вітаміну В 12 шляхом мікробної ферментації та його застосування на ринку. Біоінженерія (Базель) 2022, серпень; 9(8): 365.
31. Moore SJ, Warren MJ Анаеробний біосинтез вітаміну В 12 . біохім. Соц. пер. 2012 рік; 40 :581–586
32. Mathur Y., Sreyas S., Datar PM, Sathian MB, Hazra AB CobT і BzaC каталізують регіоспецифічну активацію та метилювання нижчого ліганду 5-гідроксибензімідазолу в анаеробному біосинтезі кобаміду. J. Biol. Chem. 2020 рік;
33. Балабанова Л., Авер'янова Л., Марченко М., Сон О., Текутьєва Л. Мікробні та генетичні ресурси для біосинтезу кобаламіну (вітамін В 12): від екосистем до промислової біотехнології. Міжн. J. Mol. Sci. 2021 рік;
34. Sobczyńska-Malefora A., Delvin E., McCaddon A., Ahmadi KR, Harrington DJ Status vitamin B 12 in Health and Disease: A Critical Review. Діагностика дефіциту та недостатності – клінічні та лабораторні підводні камені. Крит. Клін. Лабораторія. наук. 2021 рік
35. Hardlei TF, Obeid R., Herrmann W., Nexo E. Аналоги кобаламіну у людей: дослідження материнської та пуповинної крові. PLoS ОДИН. 2013 рік;
36. Кодзіма І. Процес отримання вітаміну В12 методом ферментації та мікроорганізм, що продукує вітамін В12.
37. Biedendieck R., Malten M., Barg H., Bunk B., Martens JH, Deery E., Leech H., Warren MJ, Jahn D. Метаболічна інженерія виробництва кобаламіну (вітамін В 12) у *Bacillus Megaterium*. мікроб. Біотехнологія. 2010 рік; 3 :24–37.
38. Xia W., Chen W. Промислове виробництво вітаміну В 12 *Pseudomonas denitrificans* з використанням мальтозного сиропу та кукурудзяного розчину як економічно ефективних ферментаційних субстратів. Bioprocess Biosyst. інж. 2015 рік; 38 :1065–1073.

39. CEIC China Production: Year to Date: Vitamin E [(дата доступу 21 червня 2022 р.)]. URL: <https://www.ceicdata.com/en/china/pharmaceuticalproduction-ytd-antiparasitics-vitamins-and-minerals/cn-production-ytd-vitamin-e>
40. Li KT, Liu DH, Li YL, Chu J., Wang YH, Zhuang YP, Zhang SL Вплив Zn 2+ , Co 2+ і диметилбензімідазолу на біосинтез вітаміну B 12 *Pseudomonas denitrificans* . World J. Microbiol. Біотехнологія. 2008 рік; 24 :2525–2530.
41. Li KT, Liu DH, Li YL, Chu J., Wang YH, Zhuang YP, Zhang SL Improved Large-Scale Production of Vitamin B 12 by *Pseudomonas denitrificans* with Betaine Feeding. Біоресурс. технол. 2008 рік; 99 :8516–8520.
42. . Wang Z., Wang H., Li Y., Chu J., Huang M., Zhuang Y., Zhang S. Покращене виробництво вітаміну B 12 шляхом поетапного зниження швидкості поглинання кисню під граничним рівнем розчиненого кисню під час ферментації процес. Біоресурс. технол. 2010 рік; 101 :2845–2852
43. Cheng X., Chen W., Peng W., Li K. Поліпшення процесу бродіння вітаміну B 12 шляхом додавання ротенону для регулювання метаболізму *Pseudomonas denitrificans* . апл. біохім. Біотехнологія. 2014 рік; 173 :673–681.
44. Gray MJ, Escalante-Semerena JC Перетворення одним ферментом FMNH₂ на 5,6-диметилбензімідазол, нижчий ліганд B 12 . Proc. Natl. акад. наук. США. 2007 рік; 104 :2921–2926.
45. Vandamme EJ, Revuelta JL, редактори. Промислова біотехнологія вітамінів, біопігментів та антиоксидантів. Вайлі-ВЧ; Weinheim, Німеччина: 2016.
46. Wang P., Wang Y., Liu Y., Shi H., Su Z. Нова техніка in situ видалення продукту для одночасного виробництва пропіонової кислоти та вітаміну B 12 за допомогою адсорбційного біореактора з розширеним шаром. Біоресурс. технол. 2012 рік; 104 :652–659.
47. Wang P., Jiao Y., Liu S. Нова стратегія посилення процесу ферментації для виробництва пропіонової кислоти та вітаміну B 12 *Propionibacterium freudenreichii* . J. Ind. Microbiol. Біотехнологія. 2014 рік; 41 :1811–1815.

48. Deptula P., Kylli P., Chamlagain B., Holm L., Kostianen R., Piironen V., Savijoki K., Varmanen P. Активність злитого ферменту BluB/CobT 2 розкриває механізми, відповідальні за виробництво активної форми вітаміну В 12 *Propionibacterium freudenreichii* . мікроб. Фабрики клітин. 2015 рік; 14 :186.
49. Thirupathaiah Y., Rani CS, Reddy MS, Venkateswar Rao L. Вплив хімічних і мікробних аналогів вітаміну В 12 на виробництво вітаміну В 12 . *World J. Microbiol. Біотехнологія*. 2012 рік; 28 :2267–2271.
50. Survase SA, Bajaj IB, Singhal RS Біотехнологічне виробництво вітамінів. Харчова технологія. *Біотехнологія*. 2006 рік; 44 :381–396.
51. Nielsen MJ, Rasmussen MR, Andersen CBF, Nexø E., Moestrup SK Вітамін В 12 Транспортування з їжі до клітин організму — складний багатоетапний шлях. *Нац. Гастроентерол. Гепатол.* 2012 рік; 9 :345–354.
52. Estevinho BN, Mota R., Leite JP, Tamagnini P., Gales L., Rocha F. Application of a Cyanobacterial Extracellular Polymer Substance in the Microencapsulation of Vitamin B 12 . *Порошкова технол.* 2019 рік; 343 :644–651.
53. Fidaleo M., Tacconi S., Sbarigia C., Passeri D., Rossi M., Tata AM, Dini L. Current Nanocarrier Strategies Improve Vitamin B 12 Pharmacokinetics, Ameliorate Patients' Lives, and Reduce Costs. *Наноматеріали*. 2021 рік; 11 :743.
54. Розмір глобального ринку вітаміну В12 (кобаламін ціанокобаламін) за формою, за застосуванням, за кінцевим споживачем, за географічним охопленням і прогнозом. *Verified market research*. 2024 рік ;
URL:<https://www.verifiedmarketresearch.com/product/vitamin-b12-cobalamin-cyanocobalamin-market/>

Додаток А

Технологічна схема отримання вітаміну В12



Додаток Б

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОДЕРНІЗАЦІЇ ЗМІСТУ ОСВІТИ
ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ «ЖИТОМИРСЬКА ПОЛІТЕХНІКА»
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТРАНСПОРТНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ «ЛЬВІВСЬКА ПОЛІТЕХНІКА»
ДОСЛІДНИЦЬКИЙ ЦЕНТР ЕКОЛОГІЧНОГО РОЗВИТКУ «ECOSVIT»
ЦЕНТР ЕКОЛОГІЧНОГО РОЗВИТКУ СТУДЕНТСТВА «ECOSTEP»
ПРОФЕСІЙНА АСОЦІАЦІЯ ЕКОЛОГІВ УКРАЇНИ
ПОЛІСЬКИЙ ФІЛІАЛ УКРНДІЛГА
ТОВ «ЕКО-МБ»

ТЕЗИ

Всеукраїнської наукової конференції
здобувачів вищої освіти та молодих учених
**«Екологічна безпека та раціональне
природокористування»**



м. Житомир
16 листопада 2023 року

УДК 504:378
Т11

Тези Всеукраїнської наукової конференції здобувачів вищої освіти та молодих учених «Екологічна безпека та раціональне природокористування» 16 листопада 2023 року. Житомир : Житомирська політехніка, 2023. 280 с.

УДК 504:378

Представлено доповіді учасників наукової конференції здобувачів вищої освіти та молодих учених «Екологічна безпека та раціональне природокористування». Наведено аналіз та результати досліджень сучасних проблем екології.

Конференція проводилася на базі Державного університету «Житомирська політехніка» у конференц залі університету та в онлайн режимі з використанням технологій Google Meet – 16 листопада 2023 року.

Наукове електронне видання

ТЕЗИ

Всеукраїнської наукової конференції здобувачів вищої освіти та молодих учених «Екологічна безпека та раціональне природокористування»

м. Житомир, 16 листопада 2023 року

Редактори: *І.Г. Пацева*
В.В. Мельник-Шамрай

Верстка та макетування: *І.М. Войналович*
С.В. Хоменко

Матеріали подано в авторській редакції

Об'єм даних – 81,9 МБ

Видавець і виготовник
Державний університет «Житомирська політехніка»,
вул. Чуднівська, 103, м. Житомир, 10005

Свідоцтво про внесення до Державного реєстру суб'єктів видавничої справи
ЖТ № 08 від 26.03.2004 р.

<i>Зинюк Н. М.</i> <i>Мельник-Шамрай В. В.</i>		
---	--	--

СЕКЦІЯ № 6 ІНСТРУМЕНТИ ДОСЯГНЕННЯ ЦІЛЕЙ СТАЛОГО РОЗВИТКУ

<i>Мошкіна В. В.</i> <i>Сухарев С. М.</i>	ОСОБЛИВОСТІ ЗАСТОСУВАННЯ СЕРТИФІКАЦІЇ LEED ТА BREEAM В УКРАЇНІ	240
<i>Руснак О. С.</i> <i>Кірейцева Г. В.</i>	ЕЛЕКТРОННИЙ ДОКУМЕНТООБІГ ЯК ІНСТРУМЕНТ ДЛЯ ЗЕЛЕНОГО БІЗНЕСУ	241
<i>Жук К. А.</i> <i>Максименко Н. В.</i>	ЗАБЕЗПЕЧЕНІСТЬ ЗЕЛЕНОЮ ІНФРАСТРУКТУРОЮ НАСЕЛЕННЯ М. ОДЕСА	243
<i>Паскар Я. А.</i> <i>Масюк О. М.</i>	ЕКОЛОГІЧНІ ПОСЛУГИ ЯК ІНСТРУМЕНТ ДОСЯГНЕННЯ ЦІЛЕЙ СТАЛОГО РОЗВИТКУ	244
<i>Степанченко О. М.</i> <i>Алпатова О. М.</i>	АНАЛІЗ ІННОВАЦІЙНО-ІНВЕСТИЦІЙНОЇ ДІЯЛЬНОСТІ У КОНТЕКСТІ РОЗВИТКУ АЛЬТЕРНАТИВНИХ ДЖЕРЕЛ ЕНЕРГІЇ	245
<i>Вакульчук Ю. О.</i> <i>Герасимчук О. Л.</i>	ВПРОВАДЖЕННЯ ЕКО-ІННОВАЦІЙ ДЛЯ ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ СТАЛОГО РОЗВИТКУ ПІДПРИЄМСТВА	246
<i>Іскра Я. В.</i> <i>Валерко Р. А.</i>	ЕКОЛОГІЧНИЙ ПОДАТОК ЯК СКЛАДОВА ЧАСТИНА СТАЛОГО РОЗВИТКУ	248
<i>Хоменко С. В.</i> <i>Кірейцева Г. В.</i>	МЕТОДИ ОЦІНКИ ЕФЕКТИВНОСТІ МІЖНАРОДНОГО СПІВРОБІТНИЦТВА У СФЕРІ ЕКОЛОГІЧНОГО МЕНЕДЖМЕНТУ ТА АУДИТУ	249
<i>Щербаченко І. О.</i> <i>Пономарьова Л. М.</i>	КОНТРОЛЬ ЧИСТОТИ ПОВІТРЯ НА БІОТЕХНОЛОГІЧНОМУ ВИРОБНИЦТВІ	251

СЕКЦІЯ № 7 УПРАВЛІННЯ ЗЕМЕЛЬНИМИ І ВОДНИМИ РЕСУРСАМИ

<i>Булакевич С. В.</i> <i>Николайчук М. С.</i>	ОСОБЛИВОСТІ ОПРАЦЮВАННЯ ДАНИХ РЕФЕРЕНЦІЙНИХ СТАНЦІЙ GNSS-МЕРЕЖ УКРАЇНИ	252
<i>Шихненко К. О.</i> <i>Скиба Г. В.</i>	АНАЛІЗ СУЧАСНИХ ЕКСПРЕС-МЕТОДІВ ВИЗНАЧЕННЯ МЕТАЛ-ІОНІВ У ВОДІ	254
<i>Циганенко-Дзюбенко І. Ю.</i>	WORLDS WATER CONFLICTS АБО ВІЙСЬКОВА ТАКТИКА УРАЖЕННЯ ВОДНИХ ОБ'ЄКТІВ	255
<i>Войналович Ю.</i> <i>Войналович І. М.</i>	АНТРОПОГЕННИЙ ВПЛИВ НА ЗЕМЕЛЬНІ РЕСУРСИ	257
<i>Булакевич С. В.</i> <i>Голенко М. О.</i>	НОВІ МОЖЛИВОСТІ ЗАСТОСУВАННЯ НАДЛЕГКИХ ДРОНІВ В КАДАСТРОВОМУ КАРТОГРАФУВАННІ	259
<i>Веселогузова З. Г.</i> <i>Романчук М. С.</i> <i>Грабко Н. В.</i>	ОСОБЛИВОСТІ ВОДОПОСТАЧАННЯ РЕГІОНІВ УКРАЇНИ ЗА ПОКАЗНИКАМИ ОХОПЛЕННЯ МІСТ, СЕЛИЩ МІСЬКОГО ТИПУ ТА СІЛ	261
<i>Вовк В. М.</i> <i>Циганенко-Дзюбенко І. Ю.</i>	ТОКСИЧНИЙ ВПЛИВ ВІЙСЬКОВОЇ ДІЯЛЬНОСТІ ЯК ОДИН ІЗ ФАКТОРІВ ІНТЕНСИФІКАЦІЇ ЕВТРОФІКАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ	263
<i>Генова А. В.</i> <i>Харламова О. В.</i>	ПОБУДОВА СТРУКТУРИ ІНФОРМАЦІЙНО-ТЕХНІЧНОГО ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ІНТЕГРОВАНОЇ СИСТЕМИ МОНИТОРИНГУ ГІДРОСФЕРИ	265
<i>Живюк Р. Р.</i> <i>Бусленко Г. М.</i>	ЄВРОПЕЙСЬКІ ПРАКТИКИ ТЕРИТОРІАЛЬНО-ПРОСТОРОВОГО ПЛАНУВАННЯ	266
<i>Загородній Д. О.</i> <i>Лазорчук Н. Р.</i> <i>Алпатова О. М.</i>	АНАЛІЗ ТЕХНОЛОГІЙ ҐРУНТОЗАХИСНОГО ТА РЕСУРСОЗБЕРІГАЮЧОГО ЗЕМЛЕРОБСТВА	268
<i>Івасенко Ю. Д.</i> <i>Мурашов Є. В.</i> <i>Швець Р. Я.</i>	ПІДВИЩЕННЯ РОДЮЧОСТІ ҐРУНТУ ПРИ ВИРОЩУВАННІ БОБОВИХ КУЛЬТУР ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ БІОПРЕПАРАТУ	270

Щербаченко І.О.
здобувач вищої освіти освітнього ступеня «бакалавр»
спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
Науковий керівник: Пономарьова Л.М.,
к.х.н., доц., доцент кафедри біотехнології та хімії,
Сумський національний аграрний університет
shcherbachenko.iryna@gmail.com
ponomarova.ln@gmail.com

КОНТРОЛЬ ЧИСТОТИ ПОВІТРЯ НА БІОТЕХНОЛОГІЧНОМУ ВИРОБНИЦТВІ

Повітря є несприятливим середовищем для розвитку мікроорганізмів: у ньому відсутні живильні речовини, необхідна вологість, згубним є УФ-спектр прямих сонячних променів. Проте, потрапляючи в повітря, багато мікроорганізмів можуть зберігатися в ньому більш-менш тривалий час.

Відбір проб і вимірювання забруднювачів повітря називається моніторингом якості повітря. Отримана таким чином інформація є корисною для моніторингу у здійсненні контрольних заходів щодо зниження концентрації забруднюючих речовин. При дослідженні бактеріальної забрудненості повітря враховується загальна кількість мікроорганізмів, що містяться в певному обсязі повітря, і якісний склад мікрофлори повітря.

Мікробіологічний моніторинг повітря на підприємствах, де виробляються фармацевтичні препарати та медичні вироби, є важливим і добре налагодженим. У більшості країн це нормативна вимога, і опубліковано міжнародні стандарти контролю біозабруднення в чистих приміщеннях та інших контрольованих середовищах (ISO 14698-1/2) [1]. Санітарно-бактеріологічне дослідження повітря проводиться з використанням двох методів відбору проб повітря: седиментаційним (лат. *sedimentum* – осідання) методом, запропонованим Р. Кохом, і аспіраційним методом (за допомогою аспіратора). Обидва методи можна зустріти на виробництвах, але аспіраційні методи відбору проб стали важливим інструментом моніторингу навколишнього середовища, особливо в секторах фармацевтики та медичного обладнання. Седиментаційний метод (по Коху) – осідання мікроорганізмів під дією сили тяжіння – є найпростішим способом вивчення мікрофлори повітря. Він полягає в тому, що чашки Петрі із середовищем залишають відкритими на певний час потім їх закривають і витримують 24 години в термостаті. Кількість колоній, що виросли відповідає ступеню забрудненості повітря і підпорядковується правилу Омелянського: за приблизними підрахунками на площу 100 см² протягом 5 хв осідає стільки мікроорганізмів, скільки їх міститься в 10 л повітря [2]. Аспіраційний метод – це метод більш точного аналізу повітря, що базується на пропусканні певного об'єму повітря крізь стерилізоване рідке або тверде середовище, що утримує всі зважені частинки, у тому числі й мікроорганізми, після чого це середовище досліджують на кількість мікробів, що в ньому міститься. Аспіраційний метод дає можливість визначити не тільки якісний, а й кількісний вміст бактерій [2].

При санітарно-бактеріологічному дослідженні повітря проводиться визначення загального мікробного числа бактерій (ЗМЧ) і кількості індикаторних мікроорганізмів. Обидва ці інструменти використовувалися протягом багатьох років, але нещодавно було розроблено ряд дуже портативних і зручних ударних пробовідбірників спеціально для моніторингу повітря у виробничих приміщеннях та інших чутливих зонах. Більшість із них є ситовими пробовідбірниками, такими як пробовідбірники SAS які використовують контактні пластини з агаром або повнорозмірні культуральні пластини як поверхню для збору. Портативні пробовідбірники можуть бути ручними або встановленими на штативі під час відбору проб і можуть бути запрограмовані на вибірку певного об'єму повітря або послідовних проб у попередньо встановлений час. Також доступні пробовідбірники, спеціально розроблені для контролю мікробіологічної якості стиснених газів.

Для моніторингу чистих приміщень і контрольованих виробничих зон також доступні напівавтоматичні системи, які зазвичай базуються на пробовідбірниках ситового типу. У цих системах використовується кілька пробовідбірних головок, пов'язаних із центральним блоком керування, який можна запрограмувати на виконання попередньо встановленої програми відбору проб. Також можна налаштувати бездротову мережу портативних пробовідбірників повітря, керованих центральним ПК, без необхідності будь-яких електричних або вакуумних підключень. Напівавтоматичні системи часто дозволяють інтегруватися з пакетами програмного забезпечення моніторингу навколишнього середовища та контролю якості, такими як MODA-EM™ від Lonza, створюючи основу безпаперової системи для запису мікробіологічних даних [3].

Список використаних джерел

1. ДСТУ ISO 14698-2:2009 Приміщення чисті та пов'язані з ними контрольовані середовища. Контролювання рівня біологічної забрудненості (ISO 14698-2:2003, IDT) [Режим доступу: https://zakon.isu.net.ua/sites/default/files/pdf/chisti_pr_proektuvannya_budivni-3-465707.pdf]
2. Білоруська Й.С. Основи мікробіології, санітарії та гігієни. Навчальний посібник для учнів проф.-техн.навч. закладів. – К.: Техніка, 2003.
3. https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/CH/en/lonzaError?errorID=c69ebdab-2f19-4cc7-a235-329f6549db7f