

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

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

Освітньо-професійна програма «Промислова та фармацевтична біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 05 ” листопада 2025 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

БЕРЕЖНОЇ Анни Сергіївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Метаболіти бактерій роду *Bifidobacterium* для фармацевтичної промисловості»

керівник роботи СТАРОВОЙТОВА Світлана Олександрівна доц., канд.б. наук
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 05.11.2025 року № 911-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 26.11.2025

3. Вихідні дані до роботи: бактерії *Bifidobacterium*, метаболіти бактерій роду *Bifidobacterium*

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Реферат, Вступ, РОЗДІЛ 1. Метаболіти бактерій роду *Bifidobacterium*. РОЗДІЛ 2. Вітамін В₁₂, синтезований *Bifidobacterium*: перспективи для фармацевтичної галузі. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору стадій технологічного процесу. РОЗДІЛ 5. Опис технологічної схеми виділення і очищення субстанції вітаміну В₁₂. РОЗДІЛ 6. Технологічні особливості отримання вітаміну В₁₂ з субстанції. РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва. РОЗДІЛ 8. Проект заявки на корисну модель

5. Перелік графічного матеріалу Технологічна схема виділення та очищення вітаміну В₁₂ – 2 аркуші формату А1, Апаратурна схема виділення та очищення вітаміну В₁₂ – 2 аркуші формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 жовтня 2025 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	РОЗДІЛ 1. Метаболіти бактерій роду <i>Bifidobacterium</i>	01.10.2025 – 08.10.2025	
2	РОЗДІЛ 2. Вітамін В ₁₂ , синтезований <i>Bifidobacterium</i> : перспективи для фармацевтичної галузі.	09.10.2025 – 16.10.2025	
3	РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.	17.10.2025 – 24.10.2025	
4	РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору стадій технологічного процесу.	25.10.2025 – 01.11.2025	
5	РОЗДІЛ 5. Опис технологічної схеми виділення і очищення субстанції вітаміну В ₁₂ .	02.11.2025 – 09.11.2025	
6	РОЗДІЛ 6. Технологічні особливості отримання вітаміну В ₁₂ з субстанції.	02.11.2025 – 09.11.2025	
7	РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва.	10.11.2025 – 17.11.2025	
8	РОЗДІЛ 8. Проект заявки на корисну модель.	10.11.2025 – 17.11.2025	
9	Оформлення пояснювальної записки	17.11.2025 - 26.11.2025	
10	Виконання графічної частини	17.11.2025 - 26.11.2025	

Здобувач _____
(підпис)

Керівник роботи _____
(підпис)

Анна БЕРЕЖНА
(ім'я та прізвище)

Світлана СТАРОВОЙТОВА
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена проектуванню технології виділення та очищення вітаміну В₁₂, як метаболіту після культивування *B. longum BB68* для отримання мікрокапсульованого вітаміну В₁₂ у капсулах. Порівнюючи здатність мікроорганізмів до біосинтезу вітаміну В₁₂ встановлено, що найкращим біологічним агентом є штамп *B. longum BB68*.

Виходячи з розрахунків техніко-економічного обґрунтування було встановлено, що для забезпечення річної потреби у вітаміні В₁₂ необхідно 63,3 кг.

Процес виділення та очищення вітаміну В₁₂ включає (центрифугування культуральної рідини, лізис, мікрофільтрація лізату, адсорбція на гідрофобній смолі, ціанування, адсорбція за допомогою іонообмінної смоли, кристалізація). Технологічний процес отримання вітаміну В₁₂ включає отримання мікрокапсульованого вітаміну з подальшим його капсулюванням в желатинові капсули.

Кваліфікаційна робота складається зі вступу, 8 розділів, висновків та списку використаної літератури. В роботі використано 110 літературних джерел, кількість сторінок – 104. Робота містить 10 таблиць, 4 рисунків.

Ключові слова: вітамін В₁₂, *B. longum BB68*, метаболіти, біосинтез, виділення, очищення.

ABSTRACT

The qualification work is devoted to the design of the technology for the isolation and purification of vitamin B₁₂ as a metabolite after cultivation of *B. longum BB68* to obtain microencapsulated vitamin B₁₂ in capsules. Comparing the ability of microorganisms to biosynthesize vitamin B₁₂, it was established that the best biological agent is the *B. longum BB68* strain.

Based on the calculations of the feasibility study, it was established that 63,3 kg is needed to meet the annual need for vitamin B₁₂.

The process of isolation and purification of vitamin B₁₂ includes (centrifugation of the culture liquid, lysis, microfiltration of the lysate, adsorption on a hydrophobic resin, cyanation, adsorption using an ion exchange resin, crystallization). The technological process of obtaining vitamin B₁₂ includes obtaining microencapsulated vitamin with its further encapsulation in gelatin capsules.

The qualification work consists of an introduction, 8 chapters and a list of used literature. The work uses 110 literary sources, the number of pages is 104. The work contains 10 tables and 4 figures.

Key words: vitamin B₁₂, *B. longum BB68*, metabolites, biosynthesis, isolation, purification.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. Метаболіти бактерій роду <i>Bifidobacterium</i>	7
РОЗДІЛ 2. Вітамін В ₁₂ , синтезований <i>Bifidobacterium</i> : перспективи для фармацевтичної галузі.....	33
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	45
3.1. Характеристика вітаміна В ₁₂	45
3.2. Огляд ринку цільової продукції.....	48
3.3. Розрахунок річної потужності виробництва.....	52
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	54
РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору стадій технологічного процесу.....	56
4.1. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів стадій виділення та очищення вітаміну В ₁₂	56
4.2. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях.....	63
4.3. Специфікація обладнання.....	68
РОЗДІЛ 5. Опис технологічної схеми виділення і очищення субстанції вітаміну В ₁₂	72
РОЗДІЛ 6. Технологічні особливості отримання вітаміну В ₁₂ з субстанції.....	74
6.1. Обґрунтування вибору форми та упаковки Вітаміну В ₁₂	74
6.2. Специфікація обладнання.....	77
6.3. Опис технологічної схеми отримання Вітаміну В ₁₂	79
РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва.....	81
7.1. Підбір сучасних методів контролю для виробництва субстанції вітаміну В ₁₂	81
7.2. Методи контролю Вітаміну В ₁₂	84
РОЗДІЛ 8. Проект заявки на корисну модель.....	87
Висновки.....	90
Список використаної літератури.....	91

ВСТУП

У сучасному світі зростає попит на нові біоактивні сполуки, що можуть бути використані в медицині та інших галузях. Вторинні метаболіти мікроорганізмів відіграють ключову роль у цій тенденції: вони мають унікальні хімічні структури та широкий спектр біологічної активності, що робить їх важливим об'єктом досліджень і виробництва. [51]

Крім того, розвиток геноміки, біоінформатики та синтетичної біології відкрив великий резерв «прихованих» генних кластерів, що можуть забезпечувати виробництво раніше невідомих сполук. [52]

Одним із найбільш значущих продуктів мікробного синтезу є вітамін B₁₂ (ціанкобаламін) – кофермент, який бере участь у багатьох метаболічних реакціях і є незамінним для нормального функціонування нервової та кровотворної систем людини.

Важливим є оптимізація та вдосконалення технологій культивування мікроорганізмів, вилучення, очищення й концентрації цільового продукту — процесів, які визначають економічну й екологічну ефективність біотехнологічного виробництва.

У зв'язку з цим є необхідність розробки чи вдосконалення конкретної біотехнології: оптимізація умов культивування, синтез метаболіту та вдосконалення методів його виділення й очищення.

Актуальність даної теми зумовлена необхідністю розробки та оптимізації технології, яка б забезпечувала стабільний вихід вітаміну B₁₂ високої чистоти. Крім того, вдосконалення процесів виділення та очищення дає змогу скоротити стадії виробництва, зменшити кількість побічних продуктів і підвищити відтворюваність результатів.

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.04 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Разробив</i>	<i>Бережна А.С.</i>				<i>Вступ</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевірів</i>	<i>Старовойтова С.О.</i>						6	104
<i>Реценз.</i>						6		
<i>Н. Контр.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>							

РОЗДІЛ 1. Метаболіти бактерій роду *Bifidobacterium*

Біфідобактерії - це грампозитивні облігатні анаеробні бактерії, мешкають у шлунково-кишковому тракті людини. Присутність біфідобактерій пов'язана зі здоровим шлунково-кишковим трактом і сильною імунною функцією хазяїна. Вплив біфідобактерій на здоров'я включає вироблення протимікробних агентів і вітамінів, інгібування адгезії патогенів і токсинів до епітеліальних клітин і стимуляцію імунної відповіді господаря [1].

Функцій, що виконують біфідобактерії в організмі хазяїна, включають:

- виробництво та вивільнення вітамінів групи В, антиоксидантів, поліфенолів і кон'югованих лінолевих кислот;
- дозрівання імунної системи в ранньому віці і збереження імунного гомеостазу протягом життя,
- збереження бар'єрних функцій кишківника та захист від патогенів шляхом виробництва бактеріоцинів,
- зниження рН просвіту шляхом виробництва кислот і блокування адгезії патогенів до слизової оболонки кишечника[2].

Пробіотичні вторинні метаболіти, відомі як постбіотики, мають великий інтерес через їх потенційний сприятливий вплив на людей, як-от профілактика або лікування таких захворювань, як діабет, запальні захворювання, неврологічні розлади або рак [4].

Постбіотики класифікуються як метаболіти, створені мікробіотою, такі як коротколанцюгові жирні кислоти, екзополісахариди, фрагменти клітинної стінки, ферменти, білки та інші метаболіти (рис. 1). [4]

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.04 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 1. Метаболіти бактерій роду <i>Bifidobacterium</i></i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Разробив</i>	<i>Бережна А.С.</i>						7	104
<i>Перевірів</i>	<i>Старовойтова С.О.</i>							7
<i>Реценз.</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>							<i>Кафедра БТМ</i>

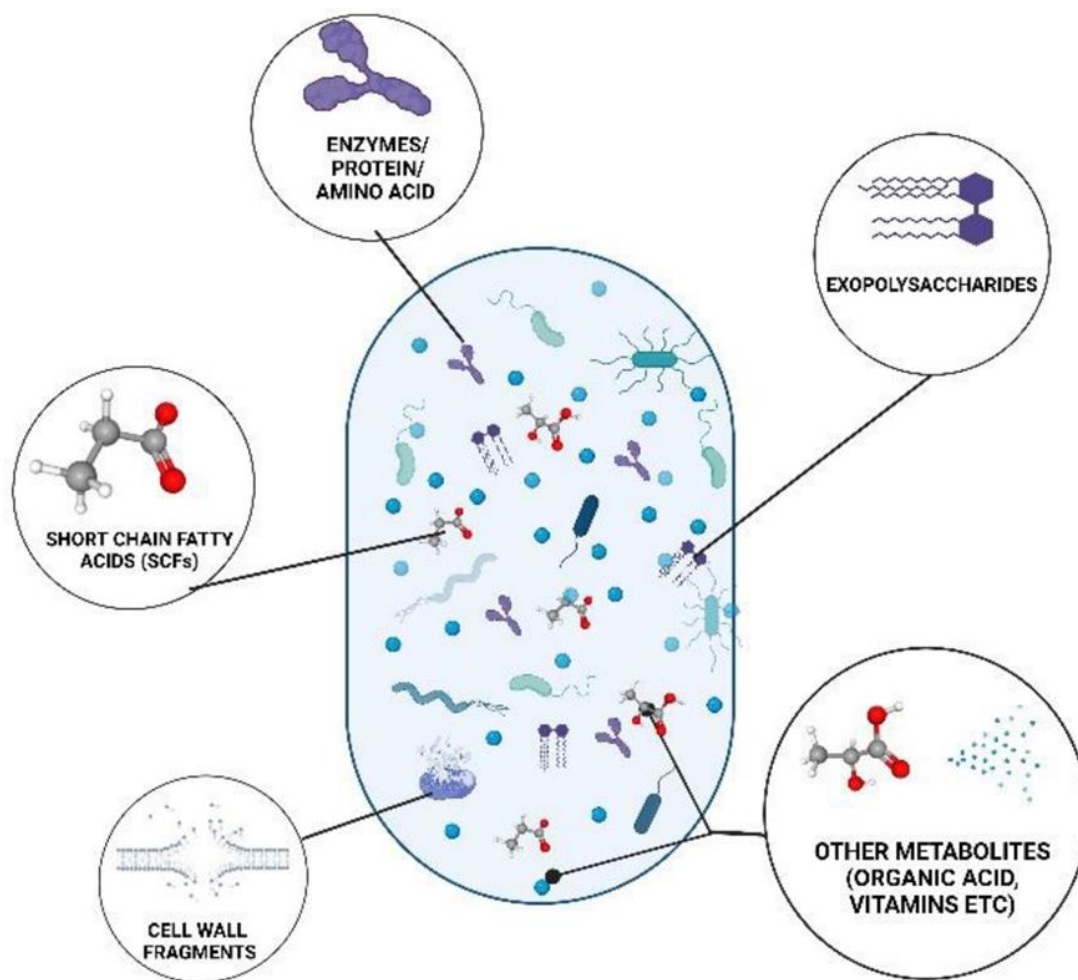


Рис.1.1 Класифікація постбіотиків [4].

Постбіотики також можна класифікувати як структурні компоненти, такі як пептиди, тейхоєві кислоти та плазмалогени. Їх також можна класифікувати на основі їх елементарного складу як:

- вуглеводи (тейхоєві кислоти та багаті галактозою полісахариди)
- білки
- ліпіди (бутират, ацетат, пропіонат, лактат, плазмалоген, похідний від диметилацетилу)
- вітаміни (вітаміни групи В та К)
- органічні кислоти (3-фенілочна кислота і пропіонова)
- інші складні молекули (ліпотейхоєві кислоти, мурупептиди, похідні від пептидогліканів).

Також можна класифікувати за їх фізіологічною функцією як: проти ожиріння, антиоксидантні, протизапальні, гіпохолестеринемічні, антигіперчутливі та антипроліферативні ефекти, демонструючи імуномодулюючі властивості [4].

Бактеріальні пробіотики виробляють вторинні метаболіти, такі як органічні кислоти, коротколанцюгові жирні кислоти, ферменти, пептиди, тейхоєві кислоти, пептидоглікани, екзополісахариди, вітаміни, плазмалогени, нейротрансмітери, біосурфактанти, амінокислоти та сполуки, похідні від флавоноїдів, такі як дезамінотирозин, екволдайдзеїн, норатірріол, терпеноїди та фенольні сполуки [6, 7].

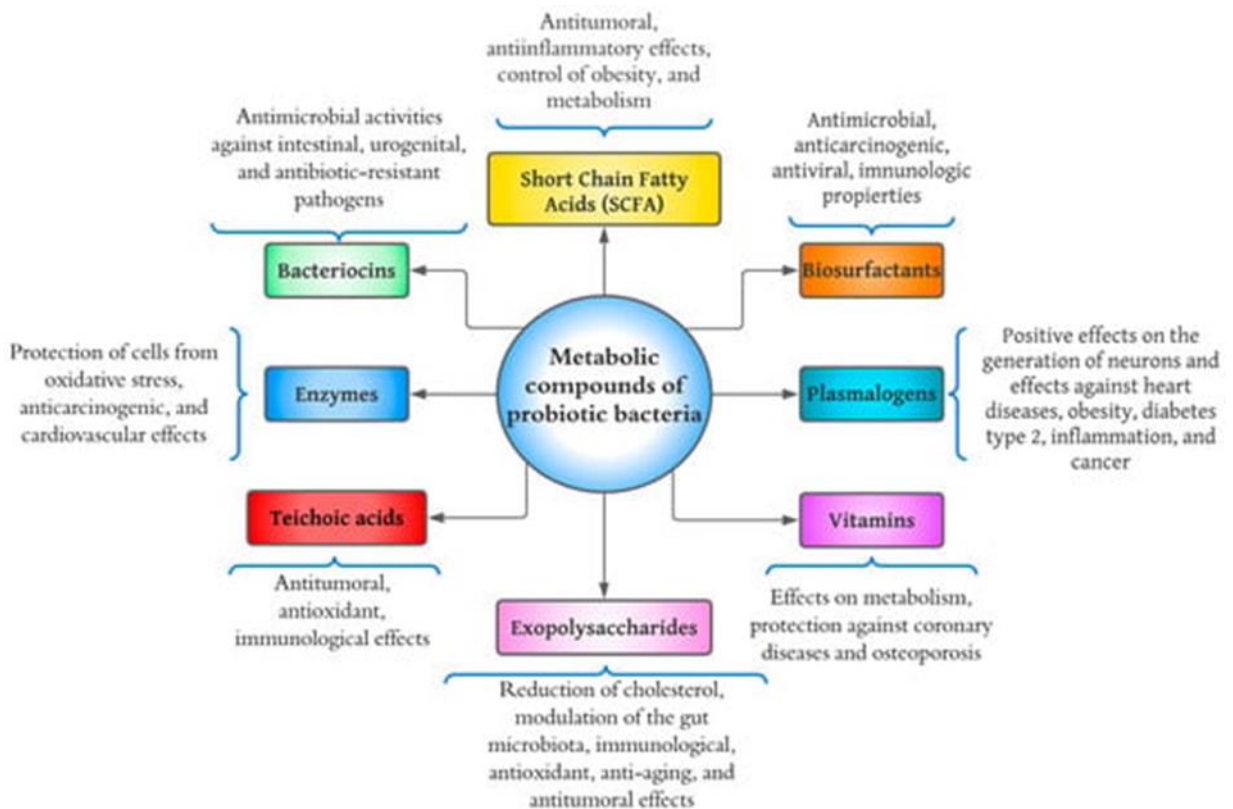


Рис.1.2 Вплив метаболітів на здоров'я [5].

Біфідобактерії здатні виробляти різні метаболіти, такі як вітаміни, поліфеноли, кон'юговані лінолеві кислоти та коротколанцюгові жирні кислоти. Біфідобактерії сприяють метаболізму організму хазяїна, беручи участь через сахаролітичне бродіння в розщепленні широкого спектру складних гліканів.

Рід *Bifidobacterium* пов'язаний з різними перевагами для здоров'я господаря, такими як захист від патогенів, включаючи виробництво ацетату для захисту від ентеропатогенної інфекції, секвестрація заліза на шкоду кишковим патогенам, конкуренція за місця зв'язування епітелію з екзополісахаридів (EPS), полегшення симптомів синдрому подразненого кишечника при застосуванні у вигляді пробіотиків і зниження ризику зараження ротавірусною діареєю. [20]

1.1. Коротколанцюгові жирні кислоти

Коротколанцюгові жирні кислоти є основними метаболітами, що утворюються в результаті ферментації *Bifidobacterium*. Ці сполуки виробляються в результаті бродіння неперетравлюваних вуглеводів кишковою мікробіотою. Виробляються – ацетат, лактат, пропіонат і бутират [9, 10].

Біфідобактерії можуть виробляти ацетат і форміат шляхом ферментації. Через сприятливий вплив пробіотиків, пребіотиків та їхніх метаболітів на здоров'я їх використовують як харчові добавки.

Бутират сприяє регенерації кишкового епітелію. Він також має протизапальні властивості, шляхом зниження експресії прозапальних цитокінів [4].

Біфідобактерії не можуть використовувати звичайний гліколітичний шлях або шлях гексозомонофосфатного шунта через відсутність альдолази та глюкозо-6-фосфат НАДФ + оксидоредуктази. Біфідобактерії продукують переважно оцтову та молочну кислоти, використовуючи пентозофосфатний шлях у присутності фруктозо-6-фосфатфосфокетолази.

Біфідобактерії виробляють ацетат і лактат, коли вуглеводи є надлишковими для їх росту (Ацетат та лактат мають властивість до зниження рН кишечника, створюючи кислотне середовище, яке сприяє розвитку бактерій і пригнічує патогенних мікроорганізмів. Ацетат та лактат мають протизапальну активність, знижують рівень запальних цитокінів у кишечнику і запобігають розвитку запальних процесів, таких як коліт або хвороба Крона.

Завдяки своїм властивостям вони можуть бути використані для лікування захворювань кишечника, регуляції метаболізму вуглеводів та підвищення імунної відповіді). А коли ростуть в умовах обмеження вуглеводів, вони виробляють ацетат і форміат (Форміат має значний потенціал у лікуванні запальних захворювань кишечника, таких як виразковий коліт або хвороба Крона, формує імуномодулюючі властивості), використовуючи шлях бродіння [12].

Коротколанцюгові жирні кислоти мають численні позитивні ефекти для підтримки добробуту людини. Позитивний метаболічний вплив коротколанцюгових жирних кислот на здоров'я є:

- важливим фактором у підтримці цілісності кишківника,
- зниженням рН просвіту,
- інгібуванням гнильних і патогенних бактерій,
- захистом цілісності кишкових епітеліальних клітин від механічного, хімічного та мікробного пошкодження,
- підвищенням мінеральної біодоступності
- постачанням енергії слизовій оболонці кишечника
- стимулюванням імунна система господаря
- зниження ризику інфекційних кишкових захворювань
- протизапальна та протипухлинна роль [17].

Біосинтез оцтової кислоти здійснювали *B. breve* UCC2003 в модифікованому середовищі mMRS без будь-якого джерела вуглеводів в анаеробних умовах при 37 °C протягом 24 год, з використанням лактози як джерела вуглецю. Вихід оцтової кислоти становить 66 mM. [24]

Використовували *B. longum* і *S. mutans* NCTC 10449. Ці бактерії витримували на анаеробному кров'яному агарі CDC при 37°C в анаеробному боксі (N₂, 80 %; H₂, 10 %; CO₂, 10 %;). Бактерії культивували в складному середовищі, що містить 1,7 % триптоні, 0,3 % дріжджового екстракту, 0,5 % NaCl, 50 mM фосфатного буферного розчину (pH 7,0), 0,5 % глюкози

(середовище TYG) або 0,5 % лактози (середовище TYL) при 37°C. утворення кислоти вимірювали за допомогою рН-стату. [25]

Культивування здійснювали з використанням штаму *B. animalis subsp. lactis* BB-12 на бульйон MRS зі складом: глюкоза 20 г/л, триптон 10 г/л, м'ясний екстракт 8 г/л, дріжджовий екстракт 4 г/л, дикалій гідрофосфат 2 г/л, твін 80 1 г/л, натрію ацетат 5 г/л, триосновний цитрат амонію 2 г/л, сульфат магнію 0,2 г/л, сульфат марганцю 0,04 г/л. При 37°C в анаеробних умовах протягом 48 годин. Та отриманим виходом ацетату 2,46 г/л. [27]

Культивували *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* KMP-H9-01. Для приготування посівного матеріалу бактерії вирощували на агарі MRS з додаванням 0,05% L-цистеїну HCl та інкубували при 37°C в анаеробній ємності протягом 72 годин. В результаті культивування молярне співвідношення молочної та оцтової кислот *B. animalis subsp. lactis* KMP-H9-01 становив 1:1,6. [28]

B. longum BB536 і *B. animalis subsp. lactis* Bb 12 культивували протягом 48 годин при 37 °C в середовищі MCB (середовище для бактерій товстої кишки), яке містило (на літр) 6,5 г бактеріологічного пептону, 5,0 г соєвого пептону, 2,5 г триптону, 3,0 г дріжджового екстракту, 2,0 г KCl, 0,2 г NaHCO₃, 4,5 г NaCl, 0,5 г MgSO₄ · 7H₂O, 0,45 г CaCl₂ · 2H₂O, 0,2 г MnSO₄ · H₂O, 0,005 г FeSO₄ · 7H₂O, 0,005 г ZnSO₄ · 7H₂O, 0,4 г цистеїну-HCl, 0,005 г геміну та 0,005 г менадіону. Середовище також містило 0,5 мл/літр H₃PO₄ і 2 мл/літр Tween 80. Культивування здійснювали анаеробно шляхом барботування середовища сумішшю 90% N₂ і 10% CO₂ при 37°C протягом 48 годин. рН контролювали автоматичним додаванням 1,5 М NaOH. Обережне перемішування (100 об/хв) використовували для підтримки однорідності середовища. Штам *B. longum* BB536 утворював оцтову кислоту, її концентрації коливалися від 130 ± 7 мМ для ферментації з глюкозою до 161 ± 2 мМ для ферментації з олігофруктозою. Під час бродіння з глюкозою утворювалися високі концентрації молочної кислоти (74 ± 4 мМ). [38]

Кількість утвореної оцтової кислоти *B. animalis subsp. lactis Bb 12* була найбільшою для бродіння з глюкозою і становила (160 ± 4 мМ). Концентрація утвореної молочної кислоти була найвищою для ферментації з лактозою (75 ± 2 мМ). [38]

Біосинтез лактату та ацетату *Bifidobacterium longum* ВІОСС 1719 здійснювався протягом 24 годин у середовищі ТРҮ (бульйон з екстрактом триптичних соєвих дріжджів). Кінцевий вихід лактату становив 3667,2 мкмоль/л, вихід ацетату – 17,569 мкмоль/л. [33]

1.2. Екзополісахариди

Екзополісахариди — це розгалужені, повторювані одиниці цукрів або похідних цукру, які є довголанцюговими полімерами з високою молекулярною вагою і виробляються переважно молочнокислими бактеріями. Екзополісахариди можна класифікувати на дві групи залежно від хімічного складу: гомополісахариди, які містять лише один тип моносахаридної одиниці (приклади включають целюлозу, леван, курдлан, пулулан і декстран тощо), і гетерополісахариди, які містять повторювані одиниці кількох різних моносахаридів (приклади включають ксантан, геллан, галактан, кефіран тощо). [13]

Екзополісахариди складають більшість бактеріальних оболонки і відіграють важливу роль у адгезії та захисті клітин. Екзополісахариди мають широкий спектр структурних варіацій, і ця різноманітність дозволяє полімерам мати різноманітну біоактивність. Ці біополімери мають потенціал для використання в біомедичних та фармацевтичних цілях завдяки їх імуномодулюючій, протипухлинній та антимуутагенній, антиоксидантній, протизапальній, антигіпертензивній, антибактеріальній та противірусній активності, зниженню холестерину. [14]

Біфідобактерії метаболізують велику кількість гліканів, які знаходяться в кишковому середовищі. Ці глікани метаболізуються за допомогою унікального шляху бродіння вуглеводів, який називається фруктозо-6-фосфокетотлазним шляхом. [18]

Біфідобактерії *Bifidobacterium longum subsp. longum 35624* культивували в середовищі де Ман Рогози та Шарпа (MRS) з додаванням 0,05% цистеїну-HCl або в посиленому клостридіальному середовищі (RCM). Культури біфідобактерій інкубували при 37°C в анаеробних умовах в анаеробній камері. Для вирощування для екстракції та очищення EPS використовували модифіковані чашки з агаром Man Rogosa та Sharpe, що містять 3% глюкози.[26]

Bifidobacterium animalis subsp. LactisSF з середовищем BS (Shanghai kanglang Biotechnology Co. Ltd., Шанхай, Китай) в анаеробному інкубаторі (Anaerobox IV, Gene Science, США) при 37 °C. Штам продемонстрував високу швидкість росту, що призвело до швидкого зниження рН після 4 годин інкубації. Через 36 годин кількість життєздатних клітин досягла 9,47 log КУО/мл з рН 3,00. Виробництво EPS, яке було пов'язане з ростом бактерій, зросло до 78,4 мг/л через 4 год і досягло 300 мг/л через 30 год. Продукція EPS стабілізувалася на цьому рівні до кінця культивування 36 год. [29]

Bifidobacterium bifidum WBIN032 культивували в середовищі MRS з додаванням 1 цистеїну 0,5 г/л при 37°C в анаеробних умовах 24 год. Концентрацію ЕПС визначали шляхом вимірювання вмісту глюкози за допомогою фенол-сульфатно-кислотного методу. Концентрація ЕПС становила 241 мг/л. [30]

1.3. Кон'юговані лінолеві кислоти

Кон'югована лінолева кислота (CLA) — це група з 18 кон'югованих дієнових кислот з атомами вуглецю в більш ніж 16 різних положеннях, що утворюють різні геометричні ізомери. Природним чином міститься в жирах і молочних продуктах жуйних тварин, її біологічні та фізіологічні переваги інтенсивно досліджуються. Фізіологічні функції CLA: протизапальну, антигіпертензивну, антиканцерогенну, антиоксидантну, антиатеросклеротичну та проти ожиріння. [21]

Завдяки високій ізомерній селективності продукту та простому процесу виділення та очищення мікробна CLA стала гарним об'єктом для досліджень.

Багато бактерій, таких як *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Clostridium* деякі штами *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* і *Pediococcus*, володіють здатністю продукувати CLA. [21]

Біосинтез кон'югованої лінолевої кислоти здійснювався штамом *Bifido bacterium lactis BB12* на MRS з додаванням вільної лінолевої кислоти. Були визначені оптимальні умови: температура 37 °C, час 24 год, з додаванням L-цистеїну, в анаеробних умовах. Кінцевий вихід метаболіту становив 105,08 мкг/мл. [21]

Біосинтез кон'югованої лінолевої кислоти штамом *B. breve CCFM683* здійснювали з 0,56 мг/мл вільної лінолевої кислоти, культивували в середовищі де Мана, Рогози та Шарпа з L-цистеїном (mMRS) при 37 °C в анаеробних умовах. Кінцева концентрація становила 0,031 мг/мл у супернатанті та 0,0046 мг/мл у клітинному осаді. [22]

Ферментацію здійснювали *Bifidobacterium breve CCFM683* з використанням горіхового молока при 37 °C протягом 20–30 годин, щоб отримати ферментоване горіхове молоко. Зразки відбирали через регулярні проміжки часу для аналізу мікробних характеристик, таких як рН і кількість життєздатних клітин. [23]

З кожного зразка ферментованого горіхового молока відбирали 0,5 мл і змішували з 4,5 мл стерильного фізіологічного розчину (9 г/л) для 10-кратного серійного розведення. Згодом 1 мл кожного зразка розведення додавали в стерильну чашку Петрі, а потім у кожен чашку вливали 15–20 мл агарового середовища MRS, після чого чашки інкубували при 37 °C протягом 48 годин. Вміст кон'югованих жирних кислот у ферментованому горіховому молоці поступово знижувався зі зменшенням кількості життєздатних бактерій. [23]

1.4. Вітаміни

В даний час тринадцять вітамінів відомі як необхідні для здоров'я людини, і вони класифікуються як жиророзчинні (вітаміни А, D, Е і К) і водорозчинні (вітамін С і вітаміни комплексу В). Людський організм не може

синтезувати більшість вітамінів, тому споживання їх зовнішньо через їжу є чудовою альтернативою.

Бактерії *Bifidobacterium* можуть синтезувати велику кількість вітамінів, таких як вітамін В1 (тіамін), вітамін В2 (рибофлавін), вітамін В9 (фолат), вітамін В12 (кобаламін) і вітамін К [6, 9].

Виробництво метаболіта є важливим, оскільки вітаміни групи В діють у синергії в гомеостазі організму, беручи участь у метаболічних процесах, таких як генерація енергії та синтез еритроцитів [4].

Bifidobacterium longum subsp. *infantis* ATCC 15697 культивували анаеробно в бульйоні MRS, що містить 0,5 г/л цистеїну HCl. Середовище складається з трьох стерильних розчинів: (А) глюкоза (стерилізований автоклавуюванням при 121°C протягом 20 хвилин); (В) розчин вітаміну (піридоксин 2 мг/л; нікотинова кислота 2 мг/л; тіамін 2 мг/л; кальцію пантотенат 1 мг/л; п-амінобензойна кислота 0,05 мг/л; біотин 0,05 мг/л; аскорбінова кислота 1 мг/л; аденін сульфат 20 мг/л; вітамін В₁₂ 0,5 мг/л стерилізований фільтрацією); (С) ацетат натрію 10 г/л ; (NH₄)₂ SO₄ 5 г/л; сечовина 2 г/л; MgSO₄ · 7 H₂O 0,2 г/л; FeSO₄ · 7 H₂O 0,01 г/л; MnSO₄ · 7 H₂O 0,007 г/л ; NaCl 0,01 г/л ; Tween 80 1 г/л ; цистеїн 0,5 г/л; автоклавують протягом 30 хв при 110°C після доведення рН до 7,0. Інкубували анаеробно при 37°C протягом 48 годин. Перемішували при 250 об/хв. Рівень рН безперервно вимірювали і підтримували на рівні 5,5. рН середовища регулювали за допомогою 1 М NaOH. Періодично відбирали проби для аналізу вуглеводів, продуктів бродіння та росту. Концентрація рибофлавіну становить 60,8 нг/мл. [31]

B. lactis BB12, *B. lactis* BB04, *B. lactis* BB420, *B. lactis* BB019, *B. lactis* BB6, *B. lactis* BB8145, *B. longum* BB68, *B. bifidum* BB22 культивували в середовищі MRS при 37 °C протягом 24 годин в анаеробних умовах. Склад середовища: Екстракт яловичини – 10 г/л; Триптон – 10 г/л; Дріжджовий екстракт – 5 г/л; Глюкоза – 20 г/л; Натрію ацетат безводний – 5 г/л; Триосновний цитрат амонію – 2 г/л; K₂HPO₄ – 2 г/л; MgSO₄·7H₂O – 0,5 г/л;

MnSO₄·4H₂O – 0,25 г/л; L-цистеїну гідрохлорид – 0,5 г/л; Твін-80 – 1 мл. Концентрація рибофлавіну становила у *B. lactis BB12* – 10,92 мкг/мл, *B. lactis BB04* – 7,99 мкг/мл, *B. lactis BB420* – 8,23 мкг/мл, *B. lactis BB019* – 15,81 мкг/мл, *B. lactis BB6* – 5,10 мкг/мл, *B. lactis BB8145* – 5,21 мкг/мл, *B. longum BB68* – 7,63 мкг/мл, *B. bifidum BB22* – 4,88 мкг/мл. [32]

Штами *B. lactis BB12*, *B. lactis BB04*, *B. lactis BB420*, *B. lactis BB019*, *B. lactis BB6*, *B. lactis BB8145*, *B. longum BB68*, *B. bifidum BB22* культивували в середовищі MRS при 37 °С протягом 24 годин в анаеробних умовах. Концентрація ціанокобаламіну становила у *B. lactis BB12* – 74,90 мкг/мл, *B. lactis BB04* – 62,23 мкг/мл, *B. lactis BB420* – 112,13 мкг/мл, *B. lactis BB019* – 81,41 мкг/мл, *B. lactis BB6* – 95,59 мкг/мл, *B. lactis BB8145* – 63,82 мкг/мл, *B. longum BB68* – 142,57 мкг/мл, *B. bifidum BB22* – 71,36 мкг/мл. [32]

Штами *B. lactis BB12*, *B. lactis BB04*, *B. lactis BB420*, *B. lactis BB019*, *B. lactis BB6*, *B. lactis BB8145*, *B. longum BB68*, *B. bifidum BB22* культивували в середовищі MRS при 37 °С протягом 24 годин в анаеробних умовах. Концентрація пантотенової кислоти становила у *B. lactis BB12* – 4560,43 мкг/мл, *B. lactis BB04* – 4274,83 мкг/мл, *B. lactis BB420* – 4708,87 мкг/мл, *B. lactis BB019* – 4231,39 мкг/мл, *B. lactis BB6* – 4262,20 мкг/мл, *B. lactis BB8145* – 4060,09 мкг/мл, *B. longum BB68* – 4330,76 мкг/мл, *B. bifidum BB22* – 4146,78 мкг/мл. [32]

Біосинтез рибофлавіну (B2) *Bifidobacterium longum* ВІОСС 1719 культивували протягом 24 годин у середовищі ТРҮ (бульйон з екстрактом триптичних соєвих дріжджів). Кінцевий вихід рибофлавіну (B2) становив 6,313 мг/л. [33]

Біосинтез ціанокобалаїну (B12) *Bifidobacterium longum* ВІОСС 1719 культивували протягом 24 годин у середовищі ТРҮ (бульйон з екстрактом триптичних соєвих дріжджів). Кінцевий вихід ціанокобаламіну (B12) становив 135,098 мг/л. [33]

B. lactis ВІ-04 культивували на середовищі МПА при 37 °С протягом 48 год. Кінцевий вихід кобаламіну становив 0,00893 мкг/мл. [50]

1.5. Ферменти

Ферменти можна визначити як білки, які каталізують біохімічні реакції. Залежно від активності або функції ферменти поділяються на шість груп: оксидоредуктази, трансферази, гідролази, ліази, ізомерази та лігази. Ферменти виконують різноманітні функції, включаючи фізіологічні, біохімічні та регуляторні. Переваги протеаз для здоров'я полягають у захисті клітин від окислювального стресу та впливі проти хвороб серця та раку.

Bifidobacterium bifidum JCM 1254 культивують у бульйоні MRS з додаванням глюкози. Умови росту складають анаеробну інкубацію при 37°C протягом 24-48 годин. У статті висвітлюється роль цього штаму в розкладанні олігосахаридів жіночого молока (НМО) за допомогою таких ферментів, як 1,2- α -L-фукозидаза (AfcA). [34]

B. breve MCC1274 культивували з кишковими епітеліальними клітинами (IEC) на середовищі Yeast Casitone (YC) при 37°C протягом 24 годин. Продукується амінотрансфераза що посилює синтез імуномодулюючих метаболітів, таких як індол-3-молочна кислота (ILA) і фенілочно кислота (PLA). [35]

B. breve BX-18 культивують при 37°C протягом 24 годин в середовищі MRS, що містило наступні компоненти: екстракт яловичини (5 г/л), екстракт дріжджів (4 г/л), глюкоза (20 г/л), Твін-80 (1,08 г/л), калію дигідрофосфат (2 г/л), натрію ацетат (5 г/л), амонію триосновний цитрат (2 г/л), магнію сульфат гептагідрат. (0,2 г/л), тетрагідрат сульфату марганцю (0,05 г/л) і гідрохлорид L-цистеїну (0,5 г/л), для посилення метаболізму триптофану та синтезу похідних індолу з потенційним імуномодулюючим ефектом. [36]

1.6. Бактеріоцини

Бактеріоцини — це поліпептиди та білки, які утворюють пори в бактеріальних мембранах і пригнічують синтез клітинної стінки [37].

Існує п'ять класів бактеріоцинів, а саме:

Клас I: Малі протеолітичні та термостійкі пептиди, суттєво модифіковані специфічними для транскрипції ферментами. Приклади: лантибіотики (нізін), сактипептид і пептиди петлі [5].

Клас II: поділяється на чотири підтипи, які є педіоциноподібними, двопептидними, круговими та лінійними, не схожими на педіоцин. Вони містять невеликі пептиди, стійкі до температури та рН [5].

Клас III: Великі термолабільні пептиди (>30 кДа) зі складною активністю та структурою. Ця група включає гелветицин, ацидофілін і лактацини (А і В) [5].

Клас IV: складається зі складних білків, сполучених з ліпідами або вуглеводами. Приклади включають лактоцин S (глікопротеїн) і мезентероцин (ліпопротеїн) [5].

Клас V: Пептиди з кільцевою структурою без посттрансляційних модифікацій, включаючи ентерокин AS-48 і газерицин А [5].

Bifidobacterium longum subsp. Infantis, *B. longum subsp. infantis LH_23*, *B. longum subsp. longum LH_1019* мають здатність виробляти бактеріоцини. Виявляють антимікробні властивості, допомагаючи цим бактеріям підтримувати конкурентну перевагу в мікробіоті кишечника.[19]

Метаболіти продуцентів роду *Bifidobacterium*

Таблиця 1,1

Продуцент	Метаболіт	Концент рація	Умови культивування	Властивості	Джерело
<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i> KMP-H9-01	Ацетат	-	при 37°C в анаеробній ємності протягом 72 годин	інгібування гнильних і патогенних бактерій	Boontun, C., Vatanyoopaisarn, S., Hankla, S., Kuraya, E. [28]
<i>B. animalis subsp. lactis</i> BB-12	Ацетат	2,46 г/л	при 37 °С в анаеробних умовах, протягом 48 год	інгібування гнильних і патогенних бактерій	Menezes, F. N. D. D., Melo, F. H. C., Vieira, A. R. S., Almeida, É. T. C., Lima, M. S., Aquino, J. S., [27]
<i>B.longum subsp. longum</i> JCM 1217	Ацетат	-	при 37 °С в анаеробних умовах,	інгібування гнильних і патогенних бактерій, зниження рН	Manome, A., Abiko, Y., Kawashima, J., Washio, J., Fukumoto, S., [25]

Продовження таблиці 1,1

<i>B. breve</i> UCC2003	Ацетат	66-67 мМ	при 37 °С протягом 24 год	інгібування гнильних і патогенних бактерій, зниження рН	Ruiz-Aceituno, L., Esteban-Torres, M., James, K., Moreno, [24]
<i>Bifidobacterium longum</i> BIOCC 1719	Ацетат	17,569 мкмоль/л	В анаеробних умовах при 37 °С протягом 24 годин	інгібування гнильних і патогенних бактерій, зниження рН	Merle Rätsep, Kalle Kilk, Mihkel Zilmer, Liina Kuus, Epp Songisepp [33]
<i>B. longum</i> BB536	Ацетат	130 мМ	В анаеробних умовах при 37 °С протягом 48 годин	інгібування гнильних і патогенних бактерій, зниження рН	Roel Van der Meulen, Tom Adriany, K ristof Verbrugghe, Luc D e Vuyst [38]
<i>B. animalis subsp. lactis Bb 12</i>	Ацетат	160 мМ	В анаеробних умовах при 37 °С протягом 48 годин	інгібування гнильних і патогенних бактерій, зниження рН	Roel Van der Meulen, Tom Adriany, K ristof Verbrugghe, Luc D e Vuyst [38]
<i>B. longum</i> BB536	Лактат	74 мМ	В анаеробних умовах при 37 °С протягом 48 годин	інгібування гнильних і патогенних бактерій, зниження рН	Roel Van der Meulen, Tom Adriany, K ristof Verbrugghe, Luc D e Vuyst [38]

Продовження таблиці 1,1

<i>B. animalis subsp. lactis Bb 12</i>	Лактат	75 мМ	В анаеробних умовах при 37 °С протягом 48 годин	інгібування гнильних і патогенних бактерій, зниження рН	Roel Van der Meulen, Tom Adriany, Kristof Verbrugghe, Luc De Vuyst [38]
<i>Bifidobacterium longum B10CC 1719</i>	Лактат	3667,2 мкмоль/л	В анаеробних умовах при 37 °С протягом 24 годин	інгібування гнильних і патогенних бактерій, зниження рН	Merle Rätsep, Kalle Kilk, Mihkel Zilmer, Liina Kuus, Epp Songisepp [33]
<i>Bifidobacterium breve DSM 20213</i>	кон'югована лінолева кислота	31 мкг/мл	37 °С в анаеробних умовах	Протизапальні властивості, антимікробні	Yang, B., Chen, H., Gao, H., Wang, J., Stanton, C., Ross, [22]
<i>Bifido bacterium lactis BB12</i>	кон'югована лінолева кислота	105,08 мкг/мл	при 37 °С протягом 24 год	Протизапальні властивості, антимікробні	Amiri, S., Mokarram, R. R., Khiabani, M. S., Bari, M. R., [21]
<i>Bifidobacterium breve CCFM683</i>	кон'югована лінолева кислота	1,29 мг/мл	при 37 °С протягом 48 годин.	Протизапальні властивості, антимікробні	Bingyong Mao, Weiling Guo, Zhouqun Huang, Xin Tang, Qiuxiang Zhang, Bo Yang, Jianxin Zhao, Shumao Cui, Hao Zhang [23]

Продовження таблиці 1,1

<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> m 35624	Екзополісахарид	-	при 37°C в анаеробних умовах	Антиоксидантні властивості	Altmann, F., Kosma, P., O'Callaghan, A., Leahy, S., Bottacini, F., Molloy, E., [26]
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>Lactis</i> SF	Екзополісахарид	300 мг/л	при 37 °C в анаеробних умовах, 36 год	Антиоксидантні властивості	R. Sharma [29]
<i>Bifidobacterium bifidum</i> WBIN032	Екзополісахарид	241 мг/л	при 37°C в анаеробних умовах 24 год	Антиоксидантні властивості	Li, S., Huang, R., Shah, N. P., Tao, X., Xiong, Y., [30]
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> ATCC 15697	Рибофлавін (вітамін B ₂)	60 нг/мл	анаеробно при 37°C протягом 48 годин. Перемішували при 250 об/хв. Рівень рН 5,5.	Антиоксидантні властивості	Ana Solopova, Francesca Bottacini, Elena Venturi degli Esposti, Alberto Amaretti, Stefano Raimondi, Maddalena Rossi, Douwe van Sinderen [31]
<i>B. lactis</i> BB12	Рибофлавін (вітамін B ₂)	10,92 мкг/мл	при 37 °C протягом 24 годин в анаеробних умовах	Антиоксидантні властивості	Jia Yin, Xiaoxia Peng, Aijun Yang, Mudi Lin, Kunfa Ji, Xiaohui Dai, Juan Huang, Li Li, Like Feng [32]

Продовження таблиці 1,1

<i>B. lactis</i> BB04	Рибофлавін (вітамін B ₂)	7,99 мкг/мл	при 37 °C протягом 24 годин анаеробних умовах	Антиоксидан тні властивості	Jia Yin, Xiaoxia Peng, Aijun Yang, Mudi Lin, Kunfa Ji, Xiaohui Dai, Juan Huang, Li Li, Like Feng [32]
<i>B. lactis</i> BB420	Рибофлавін (вітамін B ₂)	8,23 мкг/мл	при 37 °C протягом 24 годин анаеробних умовах	Антиоксидан тні властивості	Jia Yin, Xiaoxia Peng, Aijun Yang, Mudi Lin, Kunfa Ji, Xiaohui Dai, Juan Huang, Li Li, Like Feng [32]
<i>B. lactis</i> BB019	Рибофлавін (вітамін B ₂)	15,81 мкг/мл	при 37 °C протягом 24 годин анаеробних умовах	Антиоксидан тні властивості	Jia Yin, Xiaoxia Peng, Aijun Yang, Mudi Lin, Kunfa Ji, Xiaohui Dai, Juan Huang, Li Li, Like Feng [32]
<i>B. lactis</i> BB6	Рибофлавін (вітамін B ₂)	5,10 мкг/мл	при 37 °C протягом 24 годин анаеробних умовах	Антиоксидан тні властивості	Jia Yin, Xiaoxia Peng, Aijun Yang, Mudi Lin, Kunfa Ji, Xiaohui Dai, Juan Huang, Li Li, Like Feng [32]

Продовження таблиці 1,1

<i>B. lactis BB8145</i>	Рибофлавін (вітамін В ₂)	5,21 мкг/мл	при 37 °С протягом 24 годин анаеробних умовах	Антиоксидан тні властивості	Jia Yin, Xiaoxia Peng, Aijun Yang, Mudi Lin, Kunfa Ji, Xiaohui Dai, Juan Huang, Li Li, Like Feng [32]
<i>B. longum BB68</i>	Рибофлавін (вітамін В ₂)	7,63 мкг/мл	при 37 °С протягом 24 годин анаеробних умовах	Антиоксидан тні властивості	Jia Yin, Xiaoxia Peng, Aijun Yang, Mudi Lin, Kunfa Ji, Xiaohui Dai, Juan Huang, Li Li, Like Feng [32]
<i>B. bifidum BB22</i>	Рибофлавін (вітамін В ₂)	4,88 мкг/мл	при 37 °С протягом 24 годин анаеробних умовах	Антиоксидан тні властивості	Jia Yin, Xiaoxia Peng, Aijun Yang, Mudi Lin, Kunfa Ji, Xiaohui Dai, Juan Huang, Li Li, Like Feng [32]
<i>Bifidobacterium longum B10CC 1719</i>	Рибофлавін (вітамін В ₂)	6,313 мг/л	В анаеробних умовах при 37 °С протягом 24 годин	Антиоксидан тні властивості	Merle Rätsep, Kalle Kilk, Mihkel Zilmer, Liina Kuus, Epp Songisepp [33]

Продовження таблиці 1,1

<i>B. lactis</i> BB12	Кобаламін (вітамін В ₁₂)	74,90 мкг/мл	при 37 °С протягом 24 годин анаеробних умовах	Бере участь у клітинному метаболізмі, виробленні енергії	Jia Yin, Xiaoxia Peng, Aijun Yang, Mudi Lin, Kunfa Ji, Xiaohui Dai, Juan Huang, Li Li, Like Feng [32]
<i>B. lactis</i> BB04	Кобаламін (вітамін В ₁₂)	62,23 мкг/мл	при 37 °С протягом 24 годин анаеробних умовах	Бере участь у клітинному метаболізмі, виробленні енергії	Jia Yin, Xiaoxia Peng, Aijun Yang, Mudi Lin, Kunfa Ji, Xiaohui Dai, Juan Huang, Li Li, Like Feng [32]
<i>B. lactis</i> BB420	Кобаламін (вітамін В ₁₂)	112,13 мкг/мл	при 37 °С протягом 24 годин анаеробних умовах	Бере участь у клітинному метаболізмі, виробленні енергії	Jia Yin, Xiaoxia Peng, Aijun Yang, Mudi Lin, Kunfa Ji, Xiaohui Dai, Juan Huang, Li Li, Like Feng [32]
<i>B. lactis</i> BB019	Кобаламін (вітамін В ₁₂)	81,41 мкг/мл	при 37 °С протягом 24 годин анаеробних умовах	Бере участь у клітинному метаболізмі, виробленні енергії	Jia Yin, Xiaoxia Peng, Aijun Yang, Mudi Lin, Kunfa Ji, Xiaohui Dai, Juan Huang, Li Li, Like Feng [32]

Продовження таблиці 1,1

<i>B. lactis BB6</i>	Кобаламін (вітамін B ₁₂)	95,59 мкг/мл	при 37 °C протягом 24 годин анаеробних умовах	Бере участь у клітинному метаболізмі, виробленні енергії	Jia Yin, Xiaoxia Peng, Aijun Yang, Mudi Lin, Kunfa Ji, Xiaohui Dai, Juan Huang, Li Li, Like Feng [32]
<i>B. lactis BB8145</i>	Кобаламін (вітамін B ₁₂)	63,82 мкг/мл	при 37 °C протягом 24 годин анаеробних умовах	Бере участь у клітинному метаболізмі, виробленні енергії	Jia Yin, Xiaoxia Peng, Aijun Yang, Mudi Lin, Kunfa Ji, Xiaohui Dai, Juan Huang, Li Li, Like Feng [32]
<i>B. longum BB68</i>	Кобаламін (вітамін B ₁₂)	142,57 мкг/мл	при 37 °C протягом 24 годин анаеробних умовах	Бере участь у клітинному метаболізмі, виробленні енергії	Jia Yin, Xiaoxia Peng, Aijun Yang, Mudi Lin, Kunfa Ji, Xiaohui Dai, Juan Huang, Li Li, Like Feng [32]

Продовження таблиці 1,1

<i>B. bifidum</i> BB22	Вітаміни (Кобаламін, В ₁₂)	71,36 мкг/мл	при 37 °С протягом 24 годин в анаеробних умовах	Бере участь у клітинному метаболізмі, виробленні енергії	Jia Yin, Xiaoxia Peng, Aijun Yang, Mudi Lin, Kunfa Ji, Xiaohui Dai, Juan Huang, Li Li, Like Feng [32]
<i>Bifidobacterium longum</i> B10CC 1719	Кобаламін (вітамін В ₁₂)	0,135 мкг/мл	В анаеробних умовах при 37 °С протягом 24 годин	Бере участь у клітинному метаболізмі, виробленні енергії	Merle Rätsep, Kalle Kilk, Mihkel Zilmer, Liina Kuus, Epp Songisepp Merle Rätsep, Kalle Kilk, Mihkel Zilmer, Liina Kuus, Epp Songisepp [33]
<i>B. lactis</i> Bl-04	Кобаламін (вітамін В ₁₂)	0,00893 мкг/мл	В анаеробних умовах при 37 °С протягом 24 годин	Бере участь у клітинному метаболізмі, виробленні енергії	Tindjau R., Chua J.-Y., Liu S.-Q [50]
<i>B. lactis</i> BB12	Пантотенова кислота (вітамін В ₅)	4560,43 мкг/мл	при 37 °С протягом 24 годин в анаеробних умовах	Бере участь у клітинному метаболізмі, виробленні енергії	Jia Yin, Xiaoxia Peng, Aijun Yang, Mudi Lin, Kunfa Ji, Xiaohui Dai, Juan Huang, Li Li, Like Feng [32]

Продовження таблиці 1,1

<i>B. lactis BB04</i>	Пантотенова кислота (вітамін B ₅)	4274,83 мкг/мл	при 37 °C протягом 24 годин анаеробних умовах	Бере участь у клітинному метаболізмі, виробленні енергії	Jia Yin, Xiaoxia Peng, Aijun Yang, Mudi Lin, Kunfa Ji, Xiaohui Dai, Juan Huang, Li Li, Like Feng [32]
<i>B. lactis BB420</i>	Пантотенова кислота (вітамін B ₅)	4708,87 мкг/мл	при 37 °C протягом 24 годин анаеробних умовах	Бере участь у клітинному метаболізмі, виробленні енергії	Jia Yin, Xiaoxia Peng, Aijun Yang, Mudi Lin, Kunfa Ji, Xiaohui Dai, Juan Huang, Li Li, Like Feng [32]
<i>B. lactis BB019</i>	Пантотенова кислота (вітамін B ₅)	4231,39 мкг/мл	при 37 °C протягом 24 годин анаеробних умовах	Бере участь у клітинному метаболізмі, виробленні енергії	Jia Yin, Xiaoxia Peng, Aijun Yang, Mudi Lin, Kunfa Ji, Xiaohui Dai, Juan Huang, Li Li, Like Feng [32]
<i>B. lactis BB6</i>	Пантотенова кислота (вітамін B ₅)	4262,20 мкг/мл	при 37 °C протягом 24 годин анаеробних умовах	Бере участь у клітинному метаболізмі, виробленні енергії	Jia Yin, Xiaoxia Peng, Aijun Yang, Mudi Lin, Kunfa Ji, Xiaohui Dai, Juan Huang, Li Li, Like Feng [32]

Продовження таблиці 1,1

<i>B. lactis BB8145</i>	Пантотенова кислота (вітамін B ₅)	4060,09 мкг/мл	при 37 °C протягом 24 годин анаеробних умовах	Бере участь у клітинному метаболізмі, виробленні енергії	Jia Yin, Xiaoxia Peng, Aijun Yang, Mudi Lin, Kunfa Ji, Xiaohui Dai, Juan Huang, Li Li, Like Feng [32]
<i>B. longum BB68</i>	Пантотенова кислота (вітамін B ₅)	4330,76 мкг/мл	при 37 °C протягом 24 годин анаеробних умовах	Бере участь у клітинному метаболізмі, виробленні енергії	Jia Yin, Xiaoxia Peng, Aijun Yang, Mudi Lin, Kunfa Ji, Xiaohui Dai, Juan Huang, Li Li, Like Feng [32]
<i>B. bifidum BB22</i>	Пантотенова кислота (вітамін B ₅)	4146,78 мкг/мл	при 37 °C протягом 24 годин анаеробних умовах	Бере участь у клітинному метаболізмі, виробленні енергії	Jia Yin, Xiaoxia Peng, Aijun Yang, Mudi Lin, Kunfa Ji, Xiaohui Dai, Juan Huang, Li Li, Like Feng [32]
<i>Bifidobacterium bifidum JCM 1254</i>	Фермент (1,2- α -L-фукозидаза)	-	При 37°C протягом 24-48 годин	Розкладає α -1,2-зв'язані залишки фукозилу НМО.	Fushinobu S., Abou Hachem M. [34]

Закінчення таблиці 1,1

<i>Bifidobacterium breve</i> MCC1274	Фермент (Амінотрансфераза)	-	При 37°C протягом 24 годин	Посилює синтез імунomodуючих метаболітів, таких як індол-3-молочна кислота (ILA) і фенілочно кислота (PLA)	Akira Sen, Keisuke Yoshida, Yasuko Yoneda, Takane Katayama, Tatsuki Nishimura, Aina Gotoh, Toyoyuki Hashimoto, Toshitaka Odamaki, Shin Yoshimoto, Toshihiko Katoh, Jin-Zhong Xiao [35]
<i>B. breve</i> BX-18	Фермент (Триптофаназа)	-	При 37°C протягом 24 годин	Бере участь в обміні триптофану; Синтезує похідні індолу з імунomodуючою дією	Kailong Liu, Tian Huang, Guoqiang Yao, Lai-Yu Kwok, Zhan Yang, Heping Zhang [36]
<i>Bifidobacterium longum subsp. infantis</i>	Бактеріоцини (Лантіпептиди, Лассопептиди)	-	-	Виявляє антимікробну активність; підтримує колонізацію в кишечнику немовлят.	Di Yu, Zhangming Pei, Yutao Chen, Hongchao Wang, Yue Xiao, Hao Zhan, Wei Chen, Wenwei Lu [19]
<i>B. longum subsp. infantis</i> LH_23	Бактеріоцини типу Мічіганін-А	-	-	Виявляє антимікробні властивості;	Di Yu, Zhangming Pei, Yutao Chen, Hongchao Wang, Yue Xiao, Hao Zhan, Wei Chen, Wenwei Lu [19]
<i>B. longum subsp. longum</i> LH_1019	Меркасидіно подібний бактеріоцин	-	-	Виявляє антимікробну активність	Di Yu, Zhangming Pei, Yutao Chen, Hongchao Wang, Yue Xiao, Hao Zhan, Wei Chen, Wenwei Lu [19]

Проаналізувавши інформацію наведену в таблиці 1,1 для подальшого вибору біологічного агента та розробки технології отримання для фармацевтичної галузі обираємо метаболіт – вітамін В₁₂. Відповідно опираючись на його позитивні властивості для організму.

РОЗДІЛ 2. Вітамін В₁₂, синтезований *Bifidobacterium*: перспективи для фармацевтичної галузі

Вітаміни біотехнологічного походження перевершують хімічно синтезовані внаслідок кількох факторів. Метод отримання вітамінів за допомогою біотехнології має низьку вартість, низьке енергоспоживання та легку переробку відходів, тоді як хімічні методи зазвичай дорогі, не є екологічно чистими та схильні до утворення відходів, з дорогою утилізацією. [39]

Переваги вітамінів біотехнологічного виробництва :

- **Вплив на навколишнє середовище.** Порівняно з хімічним синтезом біотехнологічне виробництво вітамінів зменшує вплив на навколишнє середовище. [40]
- **Придатність.** Вітаміни, виготовлені біологічними методами, можуть бути більш придатними як для внутрішнього, так і для зовнішнього застосування з точки зору безпеки, біологічної активності та швидкості всмоктування. [39]
- **Методи виробництва.** Мікробна ферментація є більш екологічною та безпечнішою, ніж хімічні методи, і все частіше використовується в промисловості для збільшення виробництва різних вітамінів. [39]
- **Ринок.** Природне виробництво вітамінів шляхом ферментації є безпечним, природним і контрольованим, займає основну позицію на ринку та має вищий вихід і менше домішок порівняно з хімічно синтезованими. [39]

Станом на 2020 рік український ринок вітамінних препаратів зростає, попит зростає через те, що споживачі віддають перевагу здоров'ю [41,42].

					НУХТ БТЕК 02.01.04 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Разробив	Бережна А.С.				РОЗДІЛ 2. Вітамін В ₁₂ , синтезований <i>Bifidobacterium</i> : перспективи для фармацевтичної галузі	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевірів	Старовойтова С.О.						33	104
Реценз.						33		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.	Стабніков В.П.							

Ринок розділений між ліками та БАДами, причому останні зростають швидше [41,43]

У 2020 році ринок БАД в Україні досяг 8 млрд грн, що на 25,8% більше, ніж у 2020 році. Це зростання випереджає інші категорії «аптечного кошика», зокрема ліки, косметику та вироби медичного призначення [41].

Збільшення продажів, перехід до дорожчих варіантів, випуск нових продуктів і помірне підвищення цін стимулюють ринок дієтичних добавок. Пандемія COVID-19 спочатку спричинила зниження продажів у другому кварталі 2020 року, але ринок відновився з високими темпами зростання в четвертому кварталі 2020 року [41].

Очікується, що до 2025 року ринок вітамінів і мінералів в Україні досягне \$114,70 млн. Очікується, що він буде щорічно зростати на 3,46% між 2025 і 2029 роками, що призведе до обсягу ринку в 11,62 мільйона доларів США в 2029 році [42].

Українці більше зосереджені на здоров'ї, що збільшує попит на вітаміни та мінерали. Ця тенденція помітна серед молодих людей, які більше піклуються про своє здоров'я та готові інвестувати в продукти для здоров'я, а також серед старіючого населення, яке потребує більшої харчової підтримки [42].

На початок 2019 року в наявності було 170 найменувань вітамінних препаратів, майже половину, а саме 84 з них виготовили українські виробники. Було представлено 325 вітамінних добавок від 126 виробників, що приблизно вдвічі перевищує кількість вітамінних препаратів [43].

Лідерами аптечних продажів БАДів у 2020 році стали Delta Medical, Vorwarts Pharma, PRO-Pharma та Фармак. Усі ці компанії знаходяться в Україні [41].

АТ "Київський вітамінний завод" український фармацевтичний виробник випускає понад 100 найменувань лікарських препаратів і 20 харчових добавок. Їхня продукція експортується до країн ЄС та Азії, включаючи Латвію, Молдову, Таджикистан і Казахстан [44].

Узагальнені дані щодо порівняльної характеристики продуцентів наведено в табл. 2.1. Найбільшу кількість вітаміну утворює *B. longum* BB68 – 142,57 мкг/мл. *B. lactis* BB420 – 112,13 мкг/мл, *B. lactis* BB6 – 95,59 мкг/мл, *B. lactis* BB019 – 81,41 мкг/мл, *B. lactis* BB12 – 74,90 мкг/мл, *B. bifidum* BB22 – 71,36 мкг/мл, *B. lactis* BB8145 – 63,82 мкг/мл, *B. lactis* BB04 – 62,23 мкг/мл [32]. Найменшу кількість утворює *Bifidobacterium longum* BIOCC 1719 – 0,135 мкг/мл [33]

Що до переваг вітаміну В₁₂ отриманого культивуванням *Bifidobacterium*:

Вітамін В₁₂, отриманий через культивування бактерій роду *Bifidobacterium*, має природне походження, що знижує ризик алергічних реакцій або побічних ефектів, на відміну від синтетичного синтезу [45,46]. Ці бактерії є частиною нормальної мікрофлори кишечника, що забезпечує їх біологічну сумісність з організмом людини [47].

Вітамін В₁₂ бере участь у синтезі нейромедіаторів і мієлінізації нервових волокон, що робить його ефективним при депресії, хворобі Альцгеймера та неврологічних розладах [49]. Біотехнологічний продукт може бути адаптований для спеціалізованих форм (наприклад, сублінгвальних таблеток) [48].

В₁₂ запобігає мегабластичній анемії, що особливо важливо для веганів, вагітних та людей похилого віку [45]. Біотехнологічні джерела вітаміну В₁₂ забезпечують стабільність дозування [48].

Вітамін В₁₂ може бути інтегрований у рослинні молочні аналоги, м'ясні замінники або ферментовані продукти, підвищуючи їх харчову цінність без синтетичних добавок [49].

Біотехнологічні форми, наприклад мікрокапсули, можуть забезпечувати поступове вивільнення вітаміну, що покращує його поглинання [48]. На відміну від тваринних джерел, біотехнологічний В₁₂ є етичним та безпечним варіантом для рослинної дієти, що запобігає дефіцитним станам [47].

Порівняльна характеристика продуцентів вітаміну В₁₂ бактеріями роду *Bifidobacterium*

Таблиця 2.1

Біологічний агент	Склад поживного середовища:		Тривалість культивування, год	Концентрація вітаміну В ₁₂	Особливості процесу біосинтезу	Література
	компонент	концентрація, г/л				
<i>B. lactis BB12</i>	Триптон	10	24	74,90 мкг/мл	t=37°C анаеробні умови	Jia Yin, Xiaoxia Peng, Aijun Yang, Mudi Lin, Kunfa Ji, Xiaohui Dai, Juan Huang, Li Li, Like Feng. Impact of oligosaccharides on probiotic properties and B vitamins production: a comprehensive assessment of probiotic strains / International Journal of Food Science & Technology. 2024. https://doi.org/10.1111/ijfs.17328
	Глюкоза	20				
	екстракт яловичини	10				
	дріжджовий екстракт	5				
	Натрію ацетат	5				
	безводний					
	Триосновний цитрат амонію	2				
	К ₂ НРО ₄	2				
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5				
	MgSO ₄ *4H ₂ O	0.25				
L-цистеїну	0.5					

Продовження таблиці 2.1

<i>B. lactis</i> BB04	Аналогічний склад ПС		24	62,23 МКГ/МЛ	t=37°C анаеробні умови	Там же
<i>B. lactis</i> BB42 0	Аналогічний склад ПС		24	112,13 МКГ/МЛ	t=37°C анаеробні умови	Там же
<i>B. lactis</i> BB01 9	Аналогічний склад ПС		24	81,41 МКГ/МЛ	t=37°C анаеробні умови	Там же

Продовження таблиці 2.1

<i>B. lactis BB6</i>	Аналогічний склад ПС		24	95,59 мкг/мл	t=37°C анаеробні умови	Там же
<i>B. lactis BB81 45</i>	Аналогічний склад ПС		24	63,82 мкг/мл	t=37°C анаеробні умови	Там же
<i>B. longum BB 68</i>	Аналогічний склад ПС		24	142,57 мкг/мл	t=37°C анаеробні умови	Там же
<i>B. bifidum BB 22</i>	Аналогічний склад ПС		24	71,36 мкг/мл	. t=37°C анаеробні умови	Там же

Продовження таблиці 2.1

<i>Bifidobacterium longum</i> BIOC C 1719	Декстроза		15	24	0,135 мкг/мл	t=37°C анаеробні умови	Merle Rätsep, Kalle Kilk, Mihkel Zilmer, Liina Kuus, Epp Songisepp. <i>A Novel Bifidobacterium longum ssp. longum Strain with Pleiotropic Effects / Microorganisms.</i> 2024. Vol. 12, no. 1. P. 174. https://doi.org/10.3390/microorganisms12010174
	Кальцій	хлорид	0,15				
	Фосфат	калію	2				
	Хлорид	заліза	0,01				
	Магній	хлорид	0,5				
	безводний						
	Папаїновий екстракт		5				
	соєвих бобів						
	Триптон		10				
	Дріжджовий екстракт		2,5				
	Цинк	сульфат	0,25				
L-цистеїн		0,5					

Закінчення таблиці 2.1

<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> B1-04	Пептон з казеїну	10	48	0,00893 МКГ/МЛ	t=37°C анаеробні умови	Tindjau R., Chua J.-Y., Liu S.-Q. Co-culturing <i>Propionibacterium freudenreichii</i> and <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> improves short-chain fatty acids and vitamin B12 contents in soy whey. <i>Food Microbiology</i> . 2024. P. 104525. https://doi.org/10.1016/j.fm.2024.104525
	М'ясний екстракт	10				
	Дріжджовий екстракт	4				
	Глюкоза	20				
	Дикалій гідрофосфат	2				
	Tween ® 80	1				
	Диамонію цитрат	2				
	Ацетат натрію	5				
	Магній сульфат	0,2				
	Сульфат марганцю	0,04				

Щоб повноцінно порівняти біологічні агенти здійснюється прорахунок вартості поживного середовища для кожного мікроорганізму. Розрахунок представлено в таблиці 2.2.

Таблиця 2.2.

Визначення вартості поживних середовищ

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації*
<i>B. lactis</i> BB12	Глюкоза	20	87	1,74	1
<i>B. lactis</i> BB04	Триптон	10	1300	13	2
<i>B. lactis</i> BB420	екстракт яловичини	10	5 186	51,86	3
<i>B. lactis</i> BB6	дріжджовий екстракт	5	6091,1	24,36	4
<i>B. lactis</i> BB8145	Натрію ацетат безводний	5	140	0,7	5
<i>B. longum</i> BB68	Триосновний цитрат амонію	2	645	1,29	6
<i>B. bifidum</i> BB22	K ₂ HPO ₄	2	420	0,21	7
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	120	0,06	9
	MgSO ₄ *4H ₂ O	0.25	69	0,017	8
	L-цистеїн	0.5	1 450	0,725	10
	Вартість 1 л середовища ≈ 93,96				

Закінчення таблиці 2.2.

<i>Bifidobacterium longum</i> BИОСС 1719	Декстроза	15	210	3,15	12
	Кальцій хлорид	0,15	93	0,014	13
	Фосфат калію	2	150	0,3	14
	Хлорид заліза	0,01	350	0,0035	15
	Магній хлорид	0,5	95	0,0475	16
	Папаїновий екстракт соєвих бобів	5	214	1,07	11
	Триптон	10	1300	13	2
	Дріжджовий екстракт	2,5	6091,1	15,23	4
	Цинк сульфат	0,25	95	0,024	17
	L-цистеїн	0,5	1 450	0,725	10
	Вартість 1 л середовища \approx 33,56				

1 – <https://shop.hlr.ua/ua/glyukoza-pishch-218748.html>, 2 – <https://shop.hlr.ua/ua/pepton-fermentativnyy-pan-gis-12817.html>, 3 – https://labstar.com.ua/ru/pitatelnie_sredy/psr-3, 4 – <https://shop.hlr.ua/ua/drojjevoy-ekstrakt-500-g-conda-144107.html>, 5 – <https://himreagent.com.ua/ua/p2385884384-natrij-uksusnokislvj-bezvodnij.html>, 6 – <https://ukrhimekspo.uaprom.net/ua/p1098428614-ammonij-limonnokislvj-zam.html>, 7 – <https://prom.ua/ua/p1724857472-kalij-fosfornokislvj-zameschennvj.html>, 8 – https://klebrig.com.ua/ua/p2072640232-magniva-sulfat-udobrenie.html?source=merchant_center&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=Perf_Max-Turboweb&gad_source=1&gclid=Cj0KCQjw7dm-BhCoARIsALFk4v8YE0uekLxeK1hZoD9Vp_GMwUsA-

[Fa18jqTsL4muxAIwFaFVPZxs 0aAoPTEALw wcB](https://prom.ua/p1091469729-magnij-sernokislyj-vodnyj.html), 9 – <https://prom.ua/p1091469729-magnij-sernokislyj-vodnyj.html>,
 10 – <https://prom.ua/ua/p1921647813-aminokislota-tsistein-gidrohlorid.html>, 11 – <https://magical-ariva.com.ua/aktivni-komponentv/3984/>, 12 – https://estrella-shop.com.ua/kondyterski-inhredientv/dekstroza-1-kh?gclid=Cj0KCQjw7dm-BhCoARIsALFk4v_szx9SBfmN-tZiZOb1ek1rmR7ALaVtHf6p_msNmKv_gJgJJ7bMwmYaAvvBEALw_wcB, 13 – <https://reaktivov.net/kaltsi%D1%96u-khloryd/?srsrtid=AfmBOootdsu5bAHmA2tImJukX0Shv1UOI0kbI7LVh8HNvEYkZHaV5sbc>, 14 – <https://prom.ua/ua/p1091383043-kalij-fosfornokislyj-zameschennvj.html>, 15 – <https://prom.ua/ua/p1740339154-zhelezo-hloroe-1kg.html>, 16 – <https://reaktivov.net/mahnii-khloryd-1-kh/?srsrtid=AfmBOorWZORo2ndLRA3X07GXWPTXnGFahrGaEw5nCDpC7zJtQV62UNGc>, 17 – <https://prom.ua/p1305727524-tsink-sernokislyj-vodnyj.html>

За одержаними розрахунками найдешевше середовище для культивування належить *Bifidobacterium longum* BИОСС 1719. Ціна на 1 л поживного бульйону становить 33,56 грн. Найдорожче середовище використовує *B. lactis* BB12, *B. lactis* BB04, *B. lactis* BB420, *B. lactis* BB019, *B. lactis* BB6, *B. lactis* BB8145, *B. longum* BB68, *B. bifidum* BB22, його вартість складає 93,96 грн.

Показники таблиць 2.1 і 2.2 вказують, що найбільш економічно вигідним для культивування відповідно до ціни поживного середовища є штам *Bifidobacterium longum* BИОСС 1719, але відповідно до кількості продукованого вітаміну найкращим є *B. longum* BB68 – 142,57 мкг/мл.

В таблиці 2.3 був проведений підрахунок вартості орієнтованої концентрації вітаміну як показника процесу.

Визначення критичних показників продуцентів

Таблиця 2,3

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація вітаміну	Тривалість культивування, год	Кількість вітаміну, утвореного за годину, мкг/мл	Умовна вартість цільового продукту, грн/мкг
<i>B. lactis BB12</i>	93,96	74,90	24	3,12	1,25
<i>B. lactis BB04</i>	93,96	62,23	24	2,59	1,5
<i>B. lactis BB420</i>	93,96	112,13	24	4,67	0,84
<i>B. lactis BB019</i>	93,96	81,41	24	3,39	1,15
<i>B. lactis BB6</i>	93,96	95,59	24	3,98	0,98
<i>B. lactis BB8145</i>	93,96	63,82	24	2,66	1,47
<i>B. longum BB68</i>	93,96	142,57	24	5,94	0,66
<i>B. bifidum BB22</i>	93,96	71,36	24	2,97	1,32
<i>Bifidobacterium longum BIOCС 1719</i>	33,56	0,135	24	0,0056	248,59

Отже, підсумувавши данні таблиці 2.3 *B. longum BB68* є найкращим біологічним агентом. На це вказує просте та дешеве поживне середовище, найнижча умовна вартість цільового продукту (0,66 грн/мкг) та вихід вітаміну за годину (5,94 мкг/мл).

РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування

3.1 Характеристика вітаміна В₁₂.

Вітамін В₁₂ — це водорозчинний вітамін, незамінний для багатьох біологічних процесів в організмі людини, зокрема для утворення еритроцитів, роботи нервової системи та синтезу ДНК.[53] Сприяє нормальному метаболізму білків, жирів і вуглеводів. [56]

Основними біологічно активними формами є ціанокобаламін, гідроксокобаламін, метилкобаламін і аденозилкобаламін.[53]

Вітамін В₁₂ – це складна органічна сполука, що належить до вітамінів групи В. Він містить тривалентний кобальт у порфіриновій площині Корріна в центрі кільця, що робить його найбільшою та найскладнішою молекулою вітаміну. Вітамін В₁₂ – єдиний вітамін, що містить іон металу, що надає йому червоного кристалічного вигляду.[54]

Хімічні властивості

Кристалевий або порошок темно-червоного кольору, без запаху та смаку, поглинає вологу. Легко розчинний у воді та етанолі, нерозчинний у хлороформі або ефірі. Стійкий до нагрівання, але може стати неефективним під впливом окислювальних або відновлювальних речовин, важких металів, сильних кислот або лугів. [54]

Структура вітаміну В₁₂

Вітамін В₁₂ — це октаедрична сполука, що містить іони кобальту. Його центральна структура складається з коринового кільця, з'єданого з чотирма пірольними групами, та ліганду 5,6-диметилбензимідазолу. Іон кобальту хелатований з кориновим кільцем чотирма атомами азоту. Різні форми вітаміну В₁₂ мають різні аксіальні ліганди на кориновому кільці. Наприклад, гідроксил (-ОН) з'єднується з іоном кобальту, утворюючи гідроксокобаламін, дезоксиаденозин утворює дезоксиаденозилкобаламін, метил утворює

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.04 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Разробив</i>	<i>Бережна А.С.</i>						45	104
<i>Перевірів</i>	<i>Старовойтова С.О.</i>							45
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>							

метилкобаламін, а ціано утворює вітамін В₁₂. [54]

Хімічна формула:

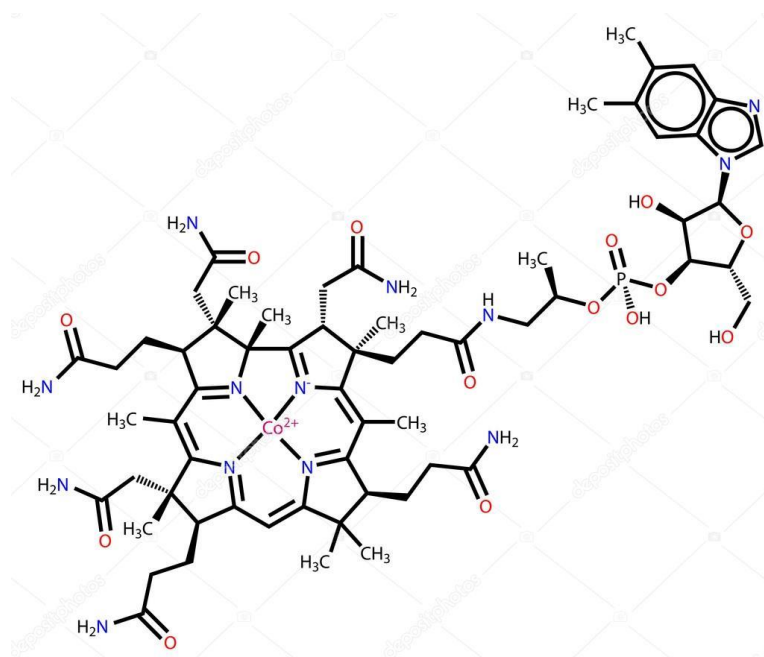


Рис. 3.1. Структурна формула вітаміна В₁₂ [55]

Молекулярна маса: 1 355,37 г/моль

Сфери застосування

Вітамін В₁₂ застосовують :

У медицині: лікування та профілактика анемії, неврологічних розладів, підтримка при веганських дієтах, лікування хвороби шлунково-кишкового тракту, після операцій на шлунку. [57]

Використовується для лікування різних випадків дефіциту вітаміну В₁₂, наприклад: лікування мегалобластної анемії, анемії, спричиненої отруєнням, апластичної анемії та лейкопенії, психозу. Також з використанням пантотенової кислоти, яка може запобігти злоякісній анемії, допомагає засвоєнню та секреції Fe²⁺ шлункової кислоти. [54]

Використовується для лікування артриту, паралічу лицьового нерва, невралгії трійчастого нерва, гепатиту, герпесу, астми та інших алергій, atopічного дерматиту, кропив'янки, екземи та бурситу; вітамін В₁₂ також може бути використаний для лікування нервозності, дратівливості, безсоння, втрати

пам'яті, лікування депресивних розладів. Нові дослідження показують, що дефіцит вітаміну B_{12} також може спричинити депресію, психічні захворювання.[54]

У сільському господарстві: як кормова добавка для тварин, особливо у птахівництві та свинарстві, для підвищення продуктивності.[58]

Вітамін B_{12} може сприяти росту та розвитку птиці, худоби, особливо індика, молодняку, покращувати використання кормового білка, і тому його можна використовувати як кормову добавку. Обробка ікри та мальків розчином вітаміну B_{12} покращує стійкість риб до токсичних речовин у воді, таких як бензол та важкі метали, та знижує смертність. [54]

В інших аспектах застосування: у розвинених країнах комплекс вітаміну B_{12} з іншими речовинами використовується в косметиці; у харчовій промисловості вітамін B_{12} використовується як барвник для шинки, ковбаси, морозива, риби, м'яса та інших харчових продуктів. У побуті розчин вітаміну B_{12} адсорбується на активованому вугіллі, цеолітах, нетканому полотні або папері для виготовлення мила, зубної пасти тощо. Його можна використовувати для дезодорації туалетів, холодильників, усуваючи запах сульфідів та альдегідів. Вітамін B_{12} також доступний для дегалогенування ґрунту та поширених забруднювачів поверхневих вод - органічних галогенідів.[54]

У промисловості: як добавка до харчових продуктів (збагачення продуктів для спеціальних груп населення).[59]

Основні групи споживачів:

- Пацієнти з анемією та неврологічними розладами.
- Люди похилого віку.
- Особи з порушенням всмоктування вітаміну (хвороби ШКТ, після операції).
- Вегани та вегетаріанці.
- Вагітні та жінки, що годують грудьми.
- Людям з пониженою кислотністю шлунку

- Людям, хворим на СНІД
- Пацієнтам, які приймають антациди, метформін для лікування діабету.
- Тваринницькі господарства. [57]

Для майбутнього виробництва цільового продукту було обрано фармацевтичну сферу застосування.

3.2 Огляд ринку цільової продукції.

Сучасна фармакологічна промисловість України та інших країн світу виготовляє вітамін В₁₂ у різних формах. Найбільш поширеними є:

- Вітамін В₁₂ в ампулах
- Вітамін В₁₂ в таблетках [60]

Вітамін В₁₂ сьогодні можна або у вигляді монопрепарату (такі ліки та вітамінні добавки складаються тільки з одного компонента), або у складі багатокомпонентних препаратів чи полівітамінних комплексів.

Прелік представників однокомпонентних та багатокомпонентних препаратів наведено в *Таблиці 3,1*.

Добова потреба вітаміну В₁₂ залежить від віку. Для дорослих вона становить 2,4 мкг на день. Для вагітних жінок та тих, що годують, — потреба у цьому вітаміні трохи більша. [57]

Таблиця 3,1

Препарати аналоги вітаміну В12 на ринку на ринку України

Назва препарату	Форма випуску	Дозування, Вміст вітаміну В12, мг	Виробник, країна походження	Тип препарату за складом	Джерело
Нейрорубін-Форте Лактаб	таблетки №20	вітамін В1 200 мг, вітамін В6 50 мг, вітамін В12 1 мг;	Мерпа, Швейцарія	Багатокомпонентний	1
Неовітам	таблетки №30	вітаміну В1 100 мг; вітаміну В6 200 мг; вітаміну В12 0,2 мг;	Київський вітамінний завод ПАТ (Україна, Київ)	Багатокомпонентний	2
Ціанокобаламін (Вітамін В12)	розчин для ін'єкцій №10	0,5 мг/мл	Галичфарм АТВТ (Україна, Львів)	Однокомпонентний	3
Нейрокобал	таблетки №90	500 мг	Kusum Healthcare (Індія)	Однокомпонентний	4

Неуробекс	таблетки №90	вітамін В1 15 мг; вітамін В6 10 мг; вітамін В12 0,02 мг;	Balkanphar та- Dupnitsa (Болгарія)	Багатокомп онентний	5
Ціанокобала мін-Дарниця (Вітамін В12- Дарниця)	розчин для ін'єкцій ампули №10	0,5 мг/мл	Дарниця ПрАТ (Україна, Київ)	Однокомпо нентний	6
Ціанокобала мін-Дарниця (Вітамін В12- Дарниця)	розчин для ін'єкцій ампули №10	0,2 мг/мл	Дарниця ПрАТ (Україна, Київ)	Однокомпо нентний	7
Нейракорд	розчин для ін'єкцій ампули №5	тіаміну гідрохлориду 50 мг, піридоксину гідрохлориду 50 мг, ціанокобаламі ну 0,5 мг;	Лекхім- Харків ЗАТ (Україна, Харків)	Багатокомп онентний	8
Неуробекс	таблетки №150	вітамін В1 15 мг; вітамін В6 10 мг; вітамін В12 0,02 мг;	Balkanphar та- Dupnitsa (Болгарія)	Багатокомп онентний	9

Мільгама	розчин ампули №5	тіаміну гідрохлориду 50 мг, піридоксину гідрохлориду 50 мг, ціанокобаламі ну 500 мкг;	Woerwag Pharma (Німеччин а)	Багатокомп онентний	10
----------	---------------------	--	--------------------------------------	------------------------	----

Примітка* (перелік препаратів на ринку України): 1 – <https://www.add.ua/ua/neyrorubin-forte-laktab-20-tabletki.html>, 2 – <https://www.add.ua/ua/neovitam-n30-tabletki.html>, 3 – <https://www.add.ua/ua/cianokobalamin-0-05-1ml-10.html>, 4 – <https://www.add.ua/ua/nejrokobal-500-mg-tabletki-90.html>, 5 – <https://www.add.ua/ua/neurobeks-tabletki-90.html>, 6 – <https://www.add.ua/ua/cianokobalamin-0-05-1-ml-10.html>, 7 – <https://www.add.ua/ua/cianokobalamin-0-02-1ml-10.html>, 8 – <https://www.add.ua/ua/nejrakord-2-ml-rozchin-dlya-in-ekcij-ampuli-5.html>, 9 – <https://www.add.ua/ua/neurobeks-tabletki-150.html#sklad>, 10 – <https://www.add.ua/ua/mil-gamma-ampuly-2-ml-5.html>

За статистикою 2024 р. в Україні на неврологічні захворювання хворіло 39% [61] населення. Це означає, що при чисельності населення України в 2024 році 29 мільйонів осіб (Враховуючи населення на підконтрольних Україні території) [62]. Відповідно кількість осіб з неврологічними захворюваннями становить 11,31 мільйонів осіб.

Згідно інструкції до лікарського засобу Неовітам [63] препарат застосовують при неврологічних захворюваннях. Неовітам є багатокомпонентним препаратом, відповідно концентрація вітаміну В₁₂ в якості діючої речовини становить 200 мкг (0,2 мг). Для дорослих рекомендована доза становить 1 таблетка на добу. Тривалість курсу лікування становить 4 тижні.

Потреба на курс лікування:

$$\text{Гдр} = 1 \text{ т} * 0,0002 \text{ г} * 28 \text{ дн} * 11 \text{ 310 000 дт} = 63 \text{ 336 г} = 63,3 \text{ кг}$$

Розрахунок річної потреби Вітаміну В₁₂

Категорії хворих	Доза препарату на добу, таблеток	Вміст вітаміну В ₁₂ в дозі препарату на добу, мг	Тривалість прийому, діб	Кількість вітаміну В ₁₂ на одну людину, г	Кількість хворих в Україні на 2024 рік, млн	Загальна кількість препарату, кг
Дорослі	1	0,2	28	0,0002	11,31	63,3
Всього						63,3

3.3 Розрахунок річної потужності виробництва.

На ринку України присутня достатня кількість перевірених імпортованих та українських виробників вітаміну В₁₂. Відповідно проаналізувавши ринок препаратів аналогів, що містять у своєму складі вітамін В₁₂, на ринку України зареєстровано 10 препаратів (таблиця 3.1). Пропоную виробляти 20% від загальної потреби.

Вироблятимемо вітамін В₁₂ в кількості:

$$(63,3 \cdot 20) / 100 = 12,66 \text{ кг/рік}$$

Обраний біологічний агент *B. longum* BB68 синтезує вітамін В₁₂ в кількості 142,57 мкг/мл = 0,14257 г/л. [64]

Об'єм культуральної рідини (X), необхідної для отримання 12,66 кг/рік вітаміну В₁₂, становить:

$$0,14257 \text{ г/л} - 1 \text{ м}^3$$

$$12,66 \text{ кг/рік} - X$$

$$X = 86,48 \text{ м}^3$$

Втрати цільового продукту при виділенні становлять 35% (центрифугування 5%, лізис 5%, мікрофільтрація 5%, адсорбція на гідрофобній смолі 5%, ціанування 5%, адсорбція на іонообмінній смолі 5%, кристалізація 5%). Враховуючи це потрібно отримати таку кількість культуральної рідини ($V_{кр}$):

$$86,48 \text{ м}^3 - 65\%$$

$$V_{кр} - 100\%$$

$$V_{кр} = (86,48 \cdot 100) / 65 = 133,05 \text{ м}^3$$

Для забезпечення річної потреби вітаміну B_{12} потрібно отримати (з урахуванням втрат під час виділення) $133,05 \text{ м}^3$ культуральної рідини ($V_{кр}$).

Розрахуємо, скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації, щоб розрахувати кількість стадій приготування посівного матеріалу. Приймаємо кількість трудоднів ($T_{тр}$) – 50, тоді об'єм культуральної рідини за добу ($V_{д}$) становить:

$$V_{д} = V_{кр} / T_{тр} = 133,05 / 50 = 2,66 \text{ м}^3$$

Кількість продукту за цикл буде становити:

$$V_{цк} = (K_1 \times V_{д} \times T_{цф}) / 24 = (1,1 \times 2,66 \times 31) / 24 = 3,78 \text{ м}^3 / \text{цикл},$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу ($T_k = 24$ год) та час підготовки ферментера до роботи ($T_{пр} = 7$ год). K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1 - 1,5$).

Підготовка ферментера ($T_{пр}$) включає: миття та огляд (1,5 год), перевірка на герметичність (0,5 год), підігрів апарату (0,5 год), стерилізація апарату (1 год), охолодження (0,5 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год), які загалом займають 7 годин.

Визначивши об'єм культуральної рідини за один цикл і знаючи коефіцієнт заповнення K_s , визначаємо геометричний об'єм ферментера:

$$V_{гф} = V_{цк} / K_s = 3,78 / 0,8 = 4,7 \text{ м}^3.$$

Найближчим за геометричним об'ємом є ферментер $V_{гф} = 5 \text{ м}^3$.

3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Виробничий біосинтез вітаміну В₁₂ здійснюють у ферментері геометричним об'ємом ($V_{ГФ}$) 5 м³ з коефіцієнтом заповнення (K_S) 0,8.

Робочий об'єм ферментера ($V_{РОБ}$) становить:

$$V_{РОБ} = V_{ГФ} \times K_S = 5 \times 0,8 = 4 \text{ м}^3$$

Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища. Отже, для одержання 4 м³ культуральної рідини потрібно:

$$V_{РОБ.1} = 4 \times 0,1 = 0,4 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу.}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати під час культивування в інокуляторі об'ємом:

$$V_{ПА1} = V_{РОБ.1} / K_S = 0,4 / 0,8 = 0,5 \text{ м}^3$$

Для отримання 0,4 м³ культуральної рідини потрібно мати:

$$V_{РОБ.2} = 0,4 \times 0,1 = 0,04 \text{ м}^3 = 40 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати під час культивування в інокуляторі об'ємом:

$$V_{ПА2} = V_{РОБ.2} / K_S = 0,04 / 0,8 = 0,05 \text{ м}^3 = 50 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Для отримання 0,04 м³ культуральної рідини потрібно мати:

$$V_{РОБ.3} = 0,04 \times 0,1 = 0,004 \text{ м}^3 = 4 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Приготування такої кількості інокуляту здійснюють в інокуляторі об'ємом:

$$V_{ІНЗ} = V_{РОБ.3} / K_S = 4 / 0,8 = 5 \text{ л.}$$

Для отримання 4 л культуральної рідини потрібно мати:

$$V_{РОБ.4} = 4 \times 0,1 = 0,4 \text{ л (400 мл) посівного матеріалу}$$

Таку кількість інокуляту отримують культивуванням у колбах на качалці. Для цього використовують колби об'ємом 750 мл з 150 мл середовища в кожній. Потрібно буде 3 колб.

Висновки щодо кількості стадій підготовки посівного матеріалу, об'ємів ферментаційного обладнання і об'ємів води для підготовки поживного середовища на всіх етапах процесу наведено у табл. 3.3.

Об'єми середовищ та апаратів для стадії підготовки посівного матеріалу та виробничого біосинтезу

Об'єм ферментера, м ³	Коефіцієнт заповнення	Робочий об'єм ферментера, м ³	Об'єм посівного матеріалу (10%), м ³	Конденсат (10%), м ³	Об'єм води для приготування композицій середовища, м ³
5	0,8	4	0,4	0,4	3,2
0,5 м ³ (500л)	0,8	0,4	40 л	40 л	0,32
0,05 м ³ (50л)	0,8	40 л	4 л	4 л	32л
5 л	0,8	4 л	0,4 л	0,4 л	3,2 л

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 5 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,8 буде проходити у чотири етапи.

РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору стадій технологічного процесу

4.1. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів стадій виділення та очищення вітаміну В₁₂.

При культивуванні *B. longum* BB68 вітамін В₁₂ локалізується внутрішньоклітинно. Тому післяферментаційні стадії в себе включають: центрифугування, лізис, мікрофільтрація, адсорбція на гідрофобній смолі, ціанування, адсорбція за допомогою іонообмінної смоли, кристалізація.

Виділення й очищення вітаміну В₁₂ здійснюється відповідно до статті [65].

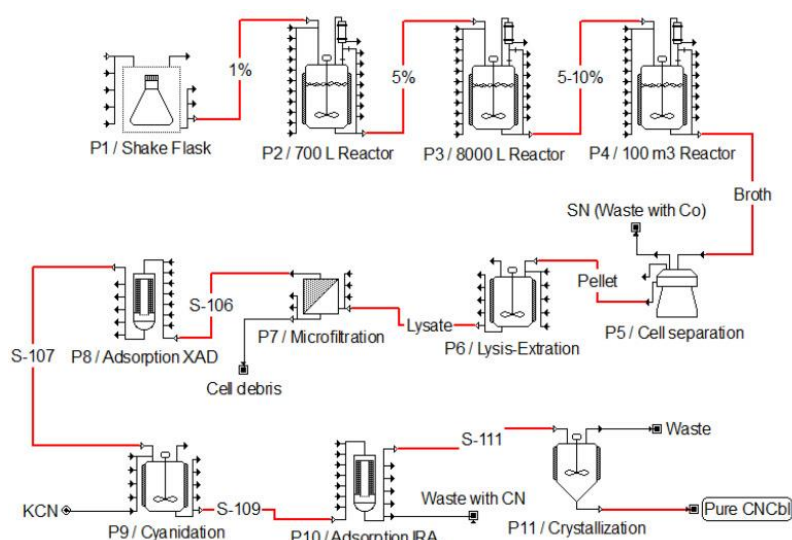


Рис. 4.1 Схема біопроцесу для отримання високочистого ціанкобаламіну [65].

1. Центрифугування

Після закінчення біосинтезу вітаміну В₁₂ у ферментері культуральна рідина містить біомасу мікроорганізмів (*Bifidobacterium*), середовище, клітинні уламки та розчинені метаболіти. Основна мета — відокремлення біомаси від культуральної рідини для подальшого вилучення вітаміну, який знаходиться внутрішньоклітинно.

Центрифугування є найбільш ефективним методом швидкого та повного розділення культуральної суспензії за рахунок дії відцентрових сил.

					НУХТ БТЕК 02.01.04 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Разробив	Бережна А.С.				РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору стадій технологічного процесу	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевірів	Старовойтова С.О.						56	104
Реценз.						56		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.	Стабніков В.П.							

Воно дозволяє отримати концентрат клітин з мінімальними втратами вітаміну та зберегти структуру клітин для подальшого виділення та очищення. [66]

Процес центрифугування характеризується перевагами, а саме висока ефективність розділення, можливість безперервної роботи, контроль чистоти фракцій. Відповідно, до недоліків процесу відноситься: високі енергозатрати, необхідність регулярного очищення апарату через накопичення біомаси, підвищене піноутворення у культурах з високим вмістом білка або полісахаридів. [66]

Розглядаючи альтернативні методи розділення культуральної рідини:

Флокуляція (електролітами, полімерними агентами) здійснює осадження клітин у вигляді флокул. Що до переваг, процес дешевий та простий у реалізації. Недоліки – неповне осадження, при введенні сторонніх реагентів можливе забруднення продукту. [67]

Глибинна фільтрація використовує пористий матеріал для утримання твердих речовин з потоку рідини всередині його матриці та на його поверхні, ефективно очищуючи потоки сировини з різними розмірами частинок та високою концентрацією твердих речовин. Переваги: обробля високу щільність клітин, легке застосування, легка масштабованість, наявність одноразових фільтрів, нижчі витрати. Недоліки: процес непридатний для безперервної роботи. [66]

Седиментація – процес осадження частинок під дією сили тяжіння. Перевага: невеликі енерговитрати. Недоліки – тривалий процес, який має низьку ефективність для дрібних клітин. [68]

Мікрофільтрація – це процес розділення під дією тиску через мембрану. Переваги – Висока селективність, відсутність зсуву клітин, можливість рекуперації середовища. Недоліки – низька швидкість фільтрації при високій в'язкості; мембранне забруднення; потребує попередньої сепарації. [66]

Центрифугування є оптимальним варіантом для розділення. Воно забезпечує найкраще співвідношення продуктивності, чистоти фракцій і стабільності процесу, що є важливим для подальших етапів.

2. Лізис

Враховуючий, що цільовий вітамін знаходиться в клітині, наступною стадією технологічного процесу є лізис який забезпечує руйнацію оболонки клітини.

Лізис — це процес руйнування клітинної оболонки (стінок, мембран), щоб вміст клітин (внутрішньоклітинні метаболіти, білки, вітаміни) став доступним у рідині.

Методи, що застосовуються для лізису клітин:

Гомогенізація під високим тиском – це високоефективний та масштабований метод руйнування клітин. Під високим тиском рідка суспензія протискується через вузьку щілину, що створює великі зсувні сили, кавітацію та ударні хвилі, які руйнують клітини. [69]

Переваги: масштабованість, ефективність, відсутність хімічних реагентів. Недоліки: високе енергоспоживання, нагрівання суспензії (потрібне охолодження), можлива надмірна інерція руйнування (зріз клітинних білків). [69]

Ультразвук це метод, за допомогою якого кавітація створюється шляхом введення ультразвукових хвиль у рідке середовище за допомогою резонансного стрижня. Це відбувається, коли бульбашки пари рідини утворюються в місці, де тиск рідини нижчий, ніж тиск її пари. Бульбашки розширюються під негативним тиском і стискаються під позитивним тиском, що призводить до різкого та потужного руйнування цих бульбашок. Його здатність діяти як метод руйнування клітин залежить від здатності сил кавітації завдавати шкоди клітинній стінці, і це залежить від складу клітинної стінки. [69]

Переваги: контролювання інтенсивності, ефективний на малих об'ємах, хороша для лабораторних досліджень. Недоліки: неефективний на великому масштабі, нагрівання, нерівномірність обробки. [69]

Термоліз нагрівання суспензії до високих температур, що призводить до денатурації клітин і руйнування стінок. Переваги: простота, не потребує складного обладнання. Недоліки: ризик деградації продукту або домішок, потреба охолодження після обробки. [70]

Хімічний лізис застосовуються, наприклад, NaOH, детергенти, мила, солі, що руйнують клітинні оболонки хімічно. Переваги: менш енерговитратний, може бути м'якший при низьких концентраціях. Недоліки: ризик залишків реагентів, потреба нейтралізації, можливе ушкодження цільового продукту або домішок, складність у масштабуванні. [70]

Вітамін B₁₂ витримує температуру до 60 °C, а сам процес лізису буде відбуватися при температурі 80 – 120 °C. Тому, найкращим методом є термоліз, у порівнянні з альтернативними методами, що мають обмежене застосування при великомасштабному виробництві через нижчий вихід, здорожчання.

3. Мікрофільтрація

Стадія мікрофільтрації забезпечує відокремлення нерозчинних клітинних залишків та макромолекули від розчиненої фракції вітаміну B₁₂, підготувавши розчин до подальшої стадії очищення (адсорбція на гідрофобній смолі). Мікрофільтрація — механічне очищення культуральної рідини після лізису, яке дозволяє: знизити мутність та вміст завислих часток, попередити засмічення сорбційних колон, стабілізувати концентрацію B₁₂ у фільтраті.

Мікрофільтрація проводиться через пористі мембрани (0,1–0,45 мкм), які ефективно затримують залишкову клітинну масу та колоїди, але пропускають розчинені низькомолекулярні сполуки, зокрема вітамін B₁₂. У сучасних виробництвах застосовується тангенційну мікрофільтрацію, що запобігає осадженню частинок на поверхні мембрани і забезпечує стабільну продуктивність при безперервній роботі. [66]

Переваги методу: Висока селективність, що дозволяє отримати прозорий фільтрат із мінімальною кількістю домішок. М'які умови — відсутність високих обертів або хімічних реагентів, що запобігає деградації термолабільного вітаміну В₁₂. Можливість масштабування, мембранні системи легко масштабуються шляхом збільшення площі фільтрації. Сумісність із наступними стадіями адсорбції та іонного обміну. Недоліки: Забруднення мембран, що потребує регулярної регенерації або зворотного промивання. Порівняно висока вартість мембранних модулів у промисловому масштабі. Зниження потоку з часом через накопичення білкових і полісахаридних залишків. [66]

4. Адсорбція на гідрофобній смолі

Стадія адсорбції на гідрофобній смолі використовується для попереднього концентрування та часткового очищення вітаміну В₁₂ від супутніх білкових і ліпідних домішок перед більш селективною іонообмінною очисткою.

Адсорбція на гідрофобній смолі відповідно до (рис.4.1) взятого з вихідної статті [65] є наступною стадією виділення та очищення вітаміну В₁₂. Адсорбція це стадія первинної очистки й концентрування після мікрофільтрації розчину, де ціль — концентрувати кориноїди на твердому носії з одночасним відділенням гідрофільних домішок (солі, амінокислоти, пептиди, кольорові пігменти). **Переваги:** висока селективність до полярних молекул через гідрофобні взаємодії, можливість концентрування продукту без великих об'ємів органіки, регенованість і можливість багаторазового використання, проста масштабованість в колонному виконанні. **Недоліки:** фолінг при наявності білкових та колоїдних домішок, зниження динамічної ємності смоли в реальних матрицях, потреба у спиртових елюентах, поступова деградація та забруднення смоли.[71]

5.Ціанування

Ціанування — це хімічна трансформація кориноїдів (наприклад гідроксокобаламіну) у стабільну фармакопейну форму ціанкобаламін (CNCbl).[65]

Після очищення на гідрофобній смолі у розчині міститься гідроксо- або аквокобаламін — це нестабільні форми вітаміну B₁₂, які легко: окислюються при контакті з киснем, втрачають координаційний зв'язок із кобальтом, мають нижчу біологічну активність та нестабільність у сухій формі. Тому на стадії ціанування проводять перетворення природних форм (гідроксо-, метил-, аденозилкобаламіну) у стабільну форму — ціанкобаламін.

Ціанування забезпечує:

Отримання стабільної, фармакопейної форми – ціанкобаламін. Гідроксокобаламіни менш стійкі до окислення, світла і тепла, введення CN⁻ у координаційну сферу кобальту утворює термодинамічно більш стабільну форму — ціанкобаламін, що краще витримує обробку, сушку та зберігання. Обробка KCN відбувається у присутності NaNO₂ та тепла. Нітрит діє як окиснювальний агент, який переводить кобальт у складі коферментної форми у більш стабільний Co³⁺. Нагрівання (40-60 °C) прискорює цю реакцію та підвищує ефективність перетворення. [65]

Що до недоліків процесу ціанування, то це: токсичність CN-іонів — потреба в герметизації процесу, датчиках повітря, аварійних процедурах та надійній системі нейтралізації або окиснення стоків.[72]

Залишковий CN у продукті та стічних водах має контролюватися і бути в межах допустимих норм. [73]

6. Адсорбція на іонообмінній смолі

Після стадії ціанування у культуральному фільтраті присутні: стабілізована форма вітаміну — ціанкобаламін, залишкові іони CN⁻, K⁺, розчинені білки, органічні кислоти, мінеральні домішки, залишкові органічні розчинники. Основна мета адсорбції на іонообмінній смолі – селективне зв'язування та концентрування іонізованих форм вітаміну B₁₂ і одночасне

видалення низькомолекулярних домішок, зокрема іонів ціаніду, солей та барвників.

Іонообмінна адсорбція — це метод, коли цільова молекула (ціанокобаламін) взаємодіє з полімерами-смолами, які містять заряджені функціональні групи (аніонні або катіонні). Смола утримує або зв'язує молекулу через іонні взаємодії, потім продукт елюють шляхом зміни іонної сили або рН середовища.[74]

Стадія іонообмінної адсорбції йде після ціанування, щоб видалити залишкові домішки, що не були видалені на попередніх етапах, і отримати продукт фармакопейної чистоти перед кристалізацією.[65]

7. Кристалізація

Кристалізація — це кінцева стадія очищення та концентрування вітаміну В₁₂, яка полягає у виділенні його у твердій (кристалічній) формі з очищеного розчину після іонообмінної адсорбції. На цьому етапі продукт набуває стабільної, фармакопейної форми, придатної для подальшого сушіння, стандартизації та фасування.

Процес кристалізації дає високу селективність: цільова молекула переходить у тверду фазу, а більшість розчинних домішок залишається в маточному розчині — це основний механізм фінальної очистки та концентрування.[75]

Кристалічна форма продукту покращує стабільність (термічну та фотостійкість) і стандартизацію продукту (фармакопейні специфікації зазвичай для кристалічного ціанокобаламіну).[76]

Процес кристалізації проводять при контрольованому охолодженні або при повільному випарюванні. Додають органічний розчинник (етанол, ізопропанол, ацетон) для зниження розчинності вітаміну й стимулювання росту кристалів.[77]

4.2. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях.

ТП 1.Зберігання культуральної рідини

ТП 1.1. Зберігання культуральної рідини.

ТП 2. Відділення біомаси

ТП 2.1 Центрифугування культуральної рідини.

ТП 3. Лізис

ТП 3.1 Осад клітин піддають лізису. Здійснюють лізис нагріванням при температурі 80–120 °С та рН 6,5–8,5 протягом 10–30 хвилин.

ТП. 4. Мікрофільтрація

ТП 4.1 Лізат фільтрують для відділення клітинних уламків. Отримують прозорий розчин, збагачений кориноїдами.

ТП 5. Адсорбція на гідрофобній смолі

ТП 5.1 Використовують гідрофобну смолу для вилучення кориноїдів з розчину. Смола забезпечує концентрування та попереднє очищення.

ТП. 6 Ціанування

ТП 6.1 Обробка кориноїдів за допомогою KCN переводить різні форми кобаламінів у стабільну форму – ціанкобаламін.

ТП. 7 Адсорбція на іонообмінній смолі

ТП 7.1 Очищення ціанкобаламіну з використанням іонообмінної смоли. Відділяються домішки, залишки ціаніду та інші небажані сполуки.

ТП. 8 Кристалізація

ТП 8.1 Очищений ціанкобаламін переводять у тверду форму. Отримують кінцевий продукт – чистий кристалічний ціанкобаламін

Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях *Таблиця 4,1*

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати АЛК (разом 35 %)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
ТП 1. Зберігання культуральної рідини						
1	ТП 1.1. Зберігання культуральної рідини	Культуральна рідина (КР)	3,78 м ³ (3780 л)	–	3,78 м ³ (3780 л)	Збірник для КР, об'єм 4,0 м ³ , з мішалкою та охолодженням
ТП 2. Відділення біомаси						
2	ТП 2.1 Центрифугування культуральної рідини.	КР	3,78 л×147,57 мг/л = 557,81 кг	5 %	529,92 кг	Центрифуга промислова; пропускна здатність 4 м ³ /год

Продовження таблиці 4,1

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати АЛК (разом 35 %)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
ТП 3. Лізис						
3	ТП 3.1.Осад клітин піддають лізису	Осад	529,92кг	5 %	503,43 кг	Реактор 4 м ³ з сорочкою нагріву, рН-контроль, перемішування
ТП. 4. Мікрофільтрація						
4	ТП 4.1 Фільтрування лізату для відділення клітинних уламків	Лізат	503,43 кг	5 %	478,26 кг	Мікрофільтраційна установка, продуктивність 2 м ³ /год;

Продовження таблиці 4,1

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати АЛК (разом 35 %)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
ТП 5. Адсорбція на гідрофобній смолі						
5	ТП 5.1 Використовують гідрофобну смолу для вилучення кориноїдів	Розчин збагачений кориноїдами	478,26 кг	5 %	454,34 кг	Колона з гідрофобною смолою
ТП. 6 Ціанування						
6	ТП 6.1 Обробка вітаміну за допомогою KCN	Кориноїди	454,34 кг	5 %	431,63 кг	Реактор-змішувач для обробки KCN (корпус з матеріалом стійким до CN, контроль рН/Т), дозувальною системою (KCN, NaNO ₂), об'єм 4 м ³ ; системи безпеки та нейтралізації CN

Закінчення таблиці 4,1

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати АЛК (разом 35 %)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
ТП. 7 Адсорбція на іонообмінній смолі						
7	ТП 7.1 Додаткове очищення ціанкобаламіна за допомогою іонообмінної хроматографії	Ціанкобаламін	431,63 кг	5 %	410,04 кг	Колона з іонообмінною смолою
ТП. 8 Кристалізація						
8	ТП 8.1 Очищений ціанкобаламін переводять у тверду форму за допомогою кристалізації.	Ціанкобаламін	410,04 кг	5 %	389,54 кг	Реактор-кристалізатор, об'єм 10 м ³

4.3. Специфікація обладнання.

Таблиця 4,2

Специфікація обладнання

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
З-1	Збірник	1	Резервуар для зберігання рідин з нержавіючої сталі, місткістю 4000 л, виготовлений з матеріалу SUS304 або SS316L для довговічності. Антикоровізне покриття, варіанти двошарової оболонки та системи контролю температури. [78]
Н-2 Н-13 Н-16 Н-17 Н-21 Н-22	Насос відцентровий	6	Відцентровий насос Alfa Laval LKH — це високоефективний, хімічно стійкий насос. Удосконалена конструкція з преміальним двигуном і напіввідкритим робочим колесом спрощує передачу процесу та мінімізує рециркуляцію. Завдяки точній конструкції, LKH підвищує продуктивність і забезпечує більшу енергоефективність, ніж аналогічні насоси. [79]
Ц-3	Центрифуга	1	Allied Industrial Dynamics (серія GX3), Пропускна здатність: 1–10 м ³ /год, тип: відцентрові декантерні центрифуги; Переваги: надійні для вижимання осаду з культуральної рідини, потужні, з довгим ресурсом експлуатації. [80]

P-4 P-8	Реактор	2	Опис: змішувальний реактор 4000 л з подвійною сорочкою (нагрів/охолодження), варіанти мішалки та вбудований/інлайн гомогенізатор (до 0–2800 об/хв), матеріал 304/316L. Підходить для хімічного та ферментативного лізису (контроль Т; рН-порт ставиться стандартно). [81]
МФ-6	Мікрофільт раційна установка	1	Модель HC-10X / серія для MF/UF, продуктивність 2м ³ /год. Особливості: корпус SS304/316, модулі порожнистих волокон або інші типи мембран, комплектна шафа з насосами, PLC/панель керування (залежить від постачальника). Підходить для харчової/молочної/ферментаційної рідини. [82]
H-5 H-7 H-9 H-12 H-14	Насос	5	ProMinent DULCOFLEX DFYa перистальтичний насос великого діапазону, Максимальна продуктивність: до 410 л/год, Робочий тиск: до 8 бар, з PLC / 4–20 mA / місцеве керування, опції для пульсового входу/частотного регулювання. Переваги: велика продуктивність при збереженні хімістійкості та простоти обслуговування. [83]

P-11	Реактор-змішувач	1	Металевий корпус (SS), внутрішнє PTFE-покриття; Для серійних робіт з ціанідами, особливо при необхідності інертного/хімічного контакту зі слабшою агресивністю середовища, з сорочкою й мішалкою. [84]
ГК-10	Колонна з гідрофобною смолою	1	AmberLite XAD макропористий, гідрофобний, стирольно-дивінілбензолний (DVB) адсорбент. Матриця: макропористий, крослінкований DVB. Поверхнева площа: ~800 м ² /г. Об'єм пор/пористість: ~0.6 мл/мл. Робочі умови: макс. температура ~150 °С. Діапазон рН: стійкість 1-14. [87]
КІ-13	Іонообмінна колонна	1	Refillable resin columns / pilot-scale колонни виробники постачають готові колонні корпуси, що дозволяють завантажити 100–150 л смоли. Особливості: Багаторазова, прозора пластикова колонка робить заміну смоли економічною та простою; Колони PETG доступні для застосувань, де можливі хімічні атаки; Забезпечує оптимальну швидкість рідини з підвищеною ефективністю смоли; Розроблено спеціально для швидкостей потоку, типових для аналізаторів хімії води; Мінімізує час затримки, необхідний для виявлення хімічних розладів. [85]

К-15	Кристалізатор	1	Реактор 10 м ³ з нержавіючої сталі SS304 з PTFE-підкладкою або інших матеріалів. Його внутрішня стінка оброблена електролітичним дзеркальним поліруванням або механічним поліруванням, тоді як зовнішня стінка виготовлена з нержавіючої сталі SS304, а зовнішня поверхня оброблена дзеркальним поліруванням або матовим поліруванням. На кристалізаційному баку встановлено вентиляційний фільтр подачі води з товщиною 0,2 мкм. [86]
Р-18 Р-19	Реактор	2	Реактор 1м ³ AISI 304 – Технічні характеристики: Матеріал AISI 304; D = 1000 мм; H = 2400 мм; V загальний = 1200 л; [88]
Р-20	Реактор	1	Реактор САРН 6,3 м ³ з якірною мішалкою і спаровою сорочкою. [89]
Ц-23	Центрифуга	1	HAUS DDI 4742 декантерна центрифуга: Діаметр шнека, мм:470; Частота обертання, об/хв: 3 400; Продуктивність (max), м.куб / год: 27; [110]

РОЗДІЛ 5. Опис технологічної схеми виділення і очищення субстанції вітаміну В₁₂

ТП 1. Зберігання культуральної рідини

ТП 1.1. Зберігання культуральної рідини

Об'єм культуральної рідини становить 3,78 м³. Зберігають культуральну рідину у збірнику (З-1) об'ємом 4 м³ за періодичного перемішування та температури 37 °С.

ТП 2. Відділення біомаси

ТП 2.1. Центрифугування культуральної рідини

Культуральну рідину зі збірника (З-1) перепускають відцентровим насосом (Н-2) через центрифугу (Ц-3) для відділення біомаси.

ТП 3. Лізис

*ТП 3.1. Лізис клітин *B. longum* ВВ68*

Біомаса від (ТП 2.1) вивантажується в реактор-гомогенізатор 4 м³ (Р-4). Де біомасу піддають лізису де вітамін В₁₂ виходить у розчин (лізат) нагріванням при температурі 80–120 °С, рН 6,5–8,5, 10–30 хвилин.

ТП 4. Мікрофільтрація

*ТП 4.1 Мікрофільтрація лізату *B. longum* ВВ68*

Лізат від (ТП 3.1) пропускають за допомогою насоса (Н-5) через мікрофільтраційну установку (МФ-6), продуктивність якої становить 2 м³/год. Розчин збагачений кориноїдами за допомогою насоса (Н-7) надходить у реактор-змішувач об'ємом 4 м³ (Р-8).

ТП 5. Адсорбція на гідрофобній смолі

ТП 5.1 Адсорбція кориноїдів на гідрофобній смолі

Розчин кориноїдів (від ТП 4.1) дозувальним насосом (Н-9) пропускають через колонку з гідрофобною смолою Amberlite XAD (ГК-10) зі швидкістю 200 л/год.[2] Кориноїди збирають в реакторі змішувачі об'ємом 5 м³ (Р-11).

					НУХТ БТЕК 02.01.04 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. Опис технологічної схеми виділення і очищення субстанції вітаміну В ₁₂	Літ.	Арк.	Аркушів
Разробив	Бережна А.С.						72	104
Перевірів	Старовойтова С.О.					72		
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

ТП. 6 Ціанування

ТП 6.1 Ціанування кориноїдів

Зібрані у реактор-змішувач (P-11) кориноїди зі стадії (ТП 5.1) піддають обробці стерильним 0,1М KCN у присутності 0,1М стерильного розчину NaNO₂ та тепла. 610 мл розчину 0,1М KCN перекачують насосом (H-16) від реактора (P-18). 610 мл 0,1М розчину NaNO₂ перекачують насосом (H-17) від реактора (P-19). Здійснюють нагрівання (40-60 °С) подачею в сорочку реактора гарячої води.

Реактор з корпусом з матеріалом стійким до CN, контроль рН та температури. Забезпечується система безпеки та нейтралізації CN, системи нейтралізації стічних вод, газоочистка, детектори CN.

ТП. 7 Адсорбція на іонообмінній смолі

ТП 7.1 Очищення ціанкобаламіна на іонообмінній смолі

Вітамін B₁₂ (від ТП 6.1) дозувальним насосом (H-12) пропускають через іонообмінну колонку з смолою Amberlite IRA900 (KI-13) зі швидкістю 200 л/год.

ТП. 8 Кристалізація

ТП 8.1 Кристалізація очищеного ціанкобаламіну

Розчин вітаміну B₁₂ від стадії (ТП 7.1) насосом (H-14) перекачують у кристалізатор (K-15). Здійснюють охолодження реактора до 5⁰С подачею в сорочку холодної води. Додають 5 554 л 80%-го розчину ацетону від реактора (P-20) за допомогою насоса (H-21) для зниження розчинності вітаміну. Після кристалізації вітамін B₁₂ перекачують насосом (H-22) до центрифуги (Ц-23) для механічного відділення твердих кристалів від рідкої фази та отримання очищеного, зневодненого продукту.

РОЗДІЛ 6. Технологічні особливості отримання вітаміну В₁₂ з субстанції

6.1. Обґрунтування вибору форми та упаковки Вітаміну В₁₂.

Форма випуску: мікрокапсульований порошок вітаміну В₁₂ у твердих желатинових капсулах.

Обрана мікрокапсульована форма з кількох причин:

Кінцевим продуктом виробництва є сухий мікрокапсульований порошок вітаміну В₁₂, який після отримання проходить етап дозування та капсулюється у тверді желатинові капсули. Вітамін В₁₂ (ціанкобаламін) є дуже чутливим до світла, до дії кисню, підвищеної температури і вологості мікрокапсульована форма допомагає знизити втрати активності в процесі зберігання і при виробництві. Комбінована форма (мікрокапсули та желатинова капсула) забезпечує максимальний захист діючої речовини та оптимізує біодоступність. [93]

Мікрокапсульовані системи дозволяють забезпечити контрольоване (або пролонговане) вивільнення діючої речовини, що може бути важливо як у фармацевтичному, так і у харчовому продукті. Желатинова капсула додає додатковий бар'єр від передчасного контакту з киснем і вологою. [93]

Мікрокапсульований порошок стабільний, не взаємодіє з желатином, зберігає активність у складі капсульного продукту тривалий час. Порошкова форма полегшує фасування, дозування, комбінування з іншими інгредієнтами, зменшує пиління чи втрати. [94]

Підвищення стабільності при впровадженні у фармацевтичні матриці: мікрокапсули можуть захистити активну речовину від взаємодій з матрицею.

При виборі оболонки мікрокапсул потрібно враховувати: біосумісність, нетоксичність, здатність формувати мікрокапсули, стабільність, контроль над вивільненням, здатність захистити ядро.

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.04 КР ПЗ</i>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Бережна А.С.				<i>РОЗДІЛ 6. Технологічні особливості отримання вітаміну В₁₂ з субстанції</i>	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевірів	Старовойтова С.О.						74	104
Реценз.						74		
Н. Контр.						<i>Кафедра БТМ</i>		
Затверд.	Стабніков В.П.							

Дослідження показують використання таких біополімерів як: арабська камедь, натрієвий альгінат, желатин, модифікований крохмаль, мальтодекстрин, пакети пектинів. [94]

Матриця (оболонковий матеріал) є критичним елементом технології мікрокапсулювання, оскільки визначає:

- захист активної речовини (ядра) від несприятливих умов (світло, кисень, волога, температура), що особливо важливо для чутливих метаболітів, таких як вітамін В₁₂;
- утворення стабільної структури капсули з бажаною морфологією, розподілом розмірів частинок, механічною міцністю та відповідною здатністю до контролю вивільнення;
- сумісність з ядром і процесом — матеріал не повинен хімічно взаємодіяти з ядром (наприклад, не має каталізувати розклад вітаміну), має бути біосумісним, нетоксичним, придатним до фармацевтичного застосування. [93]

Вуглеводні біополімери: мальтодекстрин, модифікований крохмаль, арабська камедь — легко утворюють розчини/суспензії, мають хорошу адгезію до ядра, підходять до розпилювання.

Полімери білкової природи: желатин, казеїн, білок сироватки — можуть створювати гелі або плівки, але іноді менш термостійкі. [95]

Суміші матриць (комбінація вуглеводного + білкового компонента) — дозволяють поєднувати переваги, наприклад, покращену захистність та кращу текучість порошку. [96]

Таким чином, обираємо матрицю типу: мальтодекстрин та арабська камедь у співвідношенні 1:1, із додаванням білкового компонента желатину для підвищення адгезії. Це дозволить забезпечити стабільність вітаміну В₁₂, оптимізувати текучість порошку та відповідати фармацевтичним вимогам.

Мікроінкапсуляція – це метод, який передбачає поміщення чутливих речовин (також відомих як основні або активні матеріали) у захисні матриці, які називаються інкапсулюючими агентами або носіями.

Найбільш практичною та придатною для фармацевтичного виробництва є розпилювальне сушіння, оскільки:

- дозволяє перетворити рідину або суспензію у сухий порошок за короткий час, з мінімальними втратами активної речовини;
- легко масштабується на промисловому рівні;
- сумісна з водними розчинами матриці і ядра.[95]

Отримані мікрокапсули після сушіння проходять контролі, після чого подаються на етап капсулювання.

Форма випуску та упаковка:

- Готовий продукт: сухий порошок – мікрокапсули з вітаміном В₁₂, що фасуються в капсули.
- Упаковка має забезпечувати: захист від світла (В₁₂ чутливий до фотолізу), від кисню та вологості (захист від окислення та гідролізу), зручність дозування, стандарти гігієни. Наприклад, герметичні контейнери з темного полімерного матеріалу або фольговані пакети з бар'єрним шаром, можливо з інертним газом (азотом) для зменшення окисного впливу.
- Маркування має містити: найменування, дозу вітаміну В₁₂, дату виготовлення та термін придатності, умови зберігання. [94]

6.2. Специфікація обладнання

Таблиця 6,1

Специфікація обладнання

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
P-1	Реактор	1	Об'єм 1000 літрів; Потужність (Вт) 12 кВт-75 кВт; Робочий тиск 1-200 бар; Матеріал корпусу: нержавіюча сталь AISI 304 / 304L / 316 / 316L;[97]
P-2	Реактор	1	Об'єм: 10 м ³ (10 000 л); Матеріал: 1.4571 (316Ti) нержавіюча сталь; Робочий тиск: 2 бар (для цього прикладу); Робоча температура: до 170 °С; Привід: мотор 37 кВт, швидкість мішалки 80 об/хв; Площа під установку: 2.8×2.7 м, висота 5.9 м [98]
H-3 H-4 H-6	Насос відцентровий	3	Насос відцентровий 0.6кВт Нmax 27м Qmax 90л/хв LEO 3.0 АСm60. Корпус: чавун з антикорозійною обробкою Робоче колесо: нержавіюча сталь AISI 304 Вал двигуна: нержавіюча сталь AISI 304. Підшипник: кочення (С&U) Обмотки статора: мідь Напруга: U 1 ~ 230 ± 10% В Частота: 50 Гц [99]

РГ-5	Реактор-гомогенізатор	1	Реактор 10 м ³ , Нержавіюча сталь 304/316 [100]
РШ-7	Розпилювальна сушарка	1	Розпилювальна сушарка RS-010 Продуктивність на вході 10л/год, температура на вході 50-300 °С; температура на виході 80-90 °С; час сушки 1-1,5 с; розмір 2500*1600*2800 мм [101]
К-8	Капсулятор	1	Автоматичний капсулятор NJP-800: Продуктивність 400-800 шт/хв, Розміри 800*1000*1800мм [102]
БлМ-9	Блістерна пакувальна машина	1	Блістерна пакувальна машина Haizhou Packing DPH-260: розміри (мм) 4350×1070×2200, ефективність (час/хв) 40-200 [103]
КМ-10	Картонувальна машина	1	Швидкість картонування 30-100 коробок/хв; Розміри 3150 мм × 1350 мм × 1800 мм; Потужність головного двигуна 1.5 кВт; [104]

6.3. Опис технологічної схеми отримання Вітаміну В₁₂

ТП. 1 Підготовка емульсії

ТП.1.1 Підготовка розчину вітаміну

Очищений кристалізований вітамін В₁₂ розчиняють у мінімальному об'ємі води у реакторі (Р-1). Перекачують розчинений вітамін з реактора (Р-1) за допомогою насоса (Н-3) у гомогенізаторі (Г-5).

ТП.1.2 Підготовка розчину матриці

Готують розчин матриці — мальтодекстрин (10–15 %) і арабська камедь (10 %) у воді очищеній. На технічних вагах зважують 1200 кг мальтодекстрину та 800 кг арабської камеді переміщують у реактор (Р-2). Використовуючи відцентровий насос додають 6000 л води очищеної у реактор (Р-2). З реактора (Р-2) за допомогою насоса (Н-4) перекачують у гомогенізаторі (Г-5).

ТП.1.3 Підготовка емульсії для мікрокапсулювання.

У гомогенізатор (Г-5) подають за допомогою насоса (Н-3) від (ТП.1.1) розчин вітаміну та за допомогою насоса (Н-4) від (ТП.1.2) у співвідношенні ядро: матриця (1:10) та гомогенізують протягом 5 хв до отримання однорідної емульсії.

ТП. 2 Сушіння

ТП 2.1 Сушіння емульсії у розпилювальній сушарці.

Емульсію (від ТП 1.3) з гомогенізатора (Г-5) перекачують насосом (Н-6) у розпилювальну сушарку (РШ-7) та висушують з стандартною форсункою 0,5 мм, за температури 120 °С, швидкість потоку розчину 4 мл/хв (15%), швидкість потоку повітря 32 м³/ год (80%), тиск повітря 0,6 бар.

ТП. 3 Капсулювання мікрокапсул

ТП.3.1 Капсулювання мікрокапсул у тверді желатинові капсули

Мікрокапсули (від ТП 2.1) засипають у живильний бункер капсулятора (К-8). Тверду желатинову капсулу розміру "0" наповнюють мікрокапсульованим вітаміном за допомогою капсулятора (К-8).

ПМВ 4. Фасування, маркування

ПМВ 4.1. Первинне пакування

Після капсулювання (від ТП 3.1) готові капсули надходять на лінію пакування. Капсули подають на блістерну машину (БлМ-9). Формуються комірки з ПВХ плівки. Капсули укладаються в комірки. Здійнюється запаювання алюмінієвою фольгою. На блістер наносять: назву продукту, склад, кількість капсул, номер партії, дата виготовлення, термін придатності, умови зберігання.

ПМВ 4.2. Вторинне пакування

Блістери подаються на машину вторинного пакування (КМ-10). Автоматично вкладаються у картонну коробку, додається інструкція, наноситься номер партії та дата. Після маркування отриманий продукт направляють на склад.

РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва

7.1. Підбір сучасних методів контролю для виробництва субстанції Вітаміну В₁₂

7.1.1 Кількісне визначення вітаміну В₁₂.

Зважується по 0,02 г субстанції ціанкобаламіну та стандартного зразка ціанкобаламіну (попередньо визначивши втрату в масі). Наважки випробуваного зразка та стандартного зразка розчиняють у воді та доводять до 1000 мл відповідно. Виконати вимірювання на УФ-видимому спектрофотометрі при 361 нм випробуваного зразка (A_T) та стандартного розчину (A_S), використовуючи як компенсаційний розчин воду. Розрахунки проводять за формулою:

Кількість (мг) $C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$ = кількість (мг) стандартного зразка (розраховано на суху речовину) $\times \frac{A_T}{A_S}$. [105]

7.1.2. Ідентифікація Вітаміну В₁₂

1. Ідентифікацію субстанції ціанкобаламіну пров одять використовуючи метод ультрафіолетової спектрофотометрії де здійснюють порівняння спектра випробуваного зразка з еталонним спектром ціанкобаламіну. Обидва спектра демонструють однакову інтенсивність поглинання при однакових довжинах хвиль. [105]

2. Змішати 1 мг ціанкобаламіну з 0,05 г калію гідросульфату та сплавте. Після охолодити та розбити масу склянню паличкою, додати 3 мл води та розчинити кип'ятінням. Додати одну краплю фенолфталеїну, доки не з'явиться червоний колір. Додати 0,5 г тригідрату ацетату натрію, 05 мл розведеної оцтової кислоти та 0,5 мл розчину динатрію 1-нітросо-2нафтол-3,6-дисульфонату (1:500): одразу після додавання утворюється червоний або оранжево-червоний колір.

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.04 КР ПЗ</i>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва	Літ.	Арк.	Аркушів
Разробив	Бережна А.С.						81	104
Перевірів	Старовойтова С.О.							
Реценз.								81
Н. Контр.								<i>Кафедра БТМ</i>
Затверд.	Стабніков В.П.							

Потім додається 0,5 мл хлоридної кислоти та кип'ячать 1 хв: червоний колір не зникає. [105]

3. 5 мг ціанкобаламіну переносять в колбу для дистиляції об'ємом 50 мл, розчинять у 5 мл води та додати 2,5 мл гіпофосфорної кислоти. З'єднати колбу з конденсатором та занурити його кінчик у пробірку, що містить 1 мл розчину гідроксиду натрію (1:50). Нагрівати на повільному вогні протягом 10 хв, потім перегнати 1 мл у пробірку. У пробірку додається 4 краплі насиченого розчину гексагідрату сульфату амінію заліза (II), обережно струсити, потім додати 0,03г фториду натрію та довести вміст до кипіння. негайно додати по краплях розведену сірчану кислоту (1:7) доки не утвориться прозорий розчин, потім додати 3-5 крапель розведеної сірчаної кислоти (1:7): з'являться синє або синьо-зелене забарвлення. [105]

7.1.3. рН. Розчинити 0,10 г ціанкобаламіну у 20 мл води: рН цього розчину становить від 4,2 до 7,0. [105]

7.1.4. Прозорість та кольоровість розчину. Розчинити 0,020 г ціанкобаламіну у 10 мл води. Розчин прозорий та червоного кольору. [105]

7.1.5. Втрата в масі при висушуванні. 0,05 г субстанції зваженої у сухі попередньо просушені бюкси ставлять у сушильну шафу та сушать у вакуумі (0,67 кПа) при температурі 100°C, протягом 4 годин. В якості сорбенту використовується оксид фосфору (V). Втрата в масі повинна становити не більше 12%. [105]

7.1.6 Супровідні домішки (Рідинна хроматографія)

Підготовка розчинів:

Тестовий розчин (Test solution): Взяти 10,0 мг речовини, яку аналізуємо. Розчинити у рухомій фазі. Довести об'єм до 10,0 мл рухомою фазою. Використовується протягом 1 години. [106]

Розчин для порівняння (a) (Reference solution (a)): Взяти 3,0 мл тестового розчину та довести об'єм до 100,0 мл рухомою фазою. Використовується протягом 1 години. [106]

Розчин для порівняння (b) (Reference solution (b)): Взяти 5,0 мл тестового розчину та довести до 50,0 мл рухомою фазою. Потім узяти 1,0 мл цього розчину і довести до 100,0 мл рухомою фазою. Використати протягом 1 години. [106]

Розчин для перевірки системи (c) (Reference solution (c)): Взяти 25 мг аналізованої речовини та розчинити у 10 мл води, підігриваючи при потребі. Додати: 5 мл 0.4 г/л розчину хлораміну R, 0.5 мл 0.05 М НСІ, довести об'єм до 25 мл водою. Струсити, дати постояти 5 хв. Потім узяти 1 мл цього розчину і довести до 10 мл рухомою фазою. Вводити одразу. [106]

Використовується колонка: довжина = 0.25 м, діаметр = 4 мм, стаціонарна фаза: октадецилсилікагель (С18), розмір часток 5 мкм.

Рухома фаза: 26,5 об'ємів метанолу, 73.5 частин 10 г/л розчину Na_2HPO_4 , рН = 3.5 (регулюється фосфорною кислотою). Готують і використовують протягом 2 діб. [106]

Швидкість потоку: 0.8 мл/хв.

Детектор: спектрофотометр при 361 нм.

Об'єм ін'єкції: 20 мкл.

Час аналізу: до $3\times$ довше часу утримування ціанкобаламіну (основного піку). [106]

Перевірка придатності системи (System suitability):

Хроматограма розчину (c) повинна показати 2 чіткі піки (основна речовина + продукт розкладу); Роздільна здатність (R_s) між піками ≥ 2.5 ;

Співвідношення сигнал/шум ≥ 5 для основного піку у розчині (b).

Загальний ліміт домішок (Total limit): Сума всіх піків (крім основного) не більше, ніж площа основного піку в хроматограмі розчину (a). (Це відповідає 3%). [106]

Межа нехтування (Disregard limit): Піки, площа яких менша, ніж площа основного піку у хроматограмі розчину (b), не враховують. (Це відповідає 0.1%). [106]

7.1.7. Домішка псевдоціанкобаламіну

Приготування проби: Розчиняють 1 мг зразка (вітаміну B₁₂) у 20 мл води. Переносять розчин у невеликий сепаратор додають 5 мл суміші (Рівні об'єми тетраклориду вуглецю (CCl₄ R) і свіжодистильованого о-крезолу (o-cresol R)). Суміш струшують 1 хвилину, потім дають шарам розділитися. Нижній шар (органічний, із CCl₄) переносять у новий сепаратор. Додають 2.5 мл сірчаної кислоти (570 г/л) і 2.5 мл води. Суміш струшують. [107]

Підготовка розчину порівняння: У 250 мл води розчиняють 1.5 мл розчину перманганату калію (0.002 mol/L). [107]

Відокремлений верхній шар випробуваного розчину порівнюють з еталонним. Якщо досліджуваний розчин безбарвний або не інтенсивніше забарвлений, ніж контроль – препарат відповідає нормі. [107]

7.1.8. Супровідні домішки (Тонкошарова хроматографія)

Проводять аналіз методом Тонкошарової хроматографії, використовуючи рівні частини силікагелю R1 та кізельгуру R1 як покривну речовину. Рухома фаза складається з суміші 15 об'ємів хлороформу R, 10 об'ємів метанолу R та 3 об'ємів аміаку (100 г/л). Всі операції виконуються в захищеному від світла місці. [107]

На пластинку наносять по 10 мкл кожного з 3 розчинів, що містять (А) 5,0 мг досліджуваної речовини на мл, (В) 0,20 мг досліджуваної речовини на мл та (С) 0,10 мг досліджуваної речовини на мл. [107]

Після виймання пластини з хроматографічної камери дайте їй висохнути на повітрі та перегляньте хроматограму при денному світлі. Будь-яка пляма, отримана з розчином А, крім основної плями, не є інтенсивнішою за пляму, отриману з розчином В. Не більше однієї плями, отриманої з розчином А, крім основної плями, є інтенсивнішою за пляму, отриману з розчином С.[107]

7.2. Методи контролю Вітаміну B₁₂

Морфологічний аналіз (SEM) мікрокапсул вітаміну B₁₂

Дослідження морфології частинок здійснювали методом сканувальної електронної мікроскопії на приладі Fei Quanta 400 FEG ESEM/EDAX Pegasus X4M.

Використовували мікрокапсульований порошок отриманий з желатинових капсул. Перед аналізом зразки (мікрокапсули) покривали тонким шаром золота у вакуумному напилювачі Jeol JFC 100. Отримані зображення свідчать, що мікрокапсули, незалежно від типу біополімеру, мають сферичну форму з середнім діаметром близько 3 мкм. [94]

Встановлено, що наявність шорсткої поверхні свідчить про більш щільну полімерну структуру, яка забезпечує повільніше вивільнення активної речовини. Гладкі частинки, навпаки, розчиняються швидше, забезпечуючи швидке вивільнення вітаміну у водному середовищі. [94]

Інфрачервона спектроскопія з Фур'є-перетворенням (FTIR)

Для підтвердження наявності вітаміну у капсулах використано метод інфрачервоної спектроскопії з Фур'є-перетворенням (FTIR). [94]

Дослідження проводили на спектрометрі Bomem–MB Series, Arid-Zone™ (Канада) у діапазоні 4000–650 cm^{-1} з роздільною здатністю 4 cm^{-1} .

Використовуючи отриманий з желатинових капсул порошок мікрокапсул, зразки були підготовлені з KBr (99%). 2 мг мікрокапсул та 300 мг KBr розтирали та використовуючи таблетпрес, формували диск суміші мікрокапсул та KBr.

Для біополімерів виявлено характерні смуги поглинання, що відповідають функціональним групам:

- 3700–3000 cm^{-1} – валентні коливання груп O–H і N–H;
- 3000–2850 cm^{-1} – C–H валентні коливання;
- 1645–1664 cm^{-1} – C=O (амід I);
- 1580–1600 cm^{-1} – N–H згинальні коливання (амід II);
- 1100–1000 cm^{-1} – асиметричні коливання зв'язку C–O–C.

Після включення вітамінів у полімерну матрицю з'явилися нові або посилилися характерні смуги поглинання, що підтверджує їхню присутність. Для вітаміну B₁₂ — 1664 cm^{-1} (C=O, амід I), 1572 cm^{-1} (внутрішні коливання коринового кільця), 2135 cm^{-1} (C≡N, ціаногрупа).

Порівняння спектрів біополімерів з та без вітамінів свідчить про відсутність нових хімічних зв'язків, а отже, про стабільність структури капсул та фізичну природу включення вітамінів у полімерну матрицю. [94]

Кількісне визначення вмісту вітаміну B₁₂ (UV-Vis спектрофотометрія)

Кількісне визначення вмісту вітаміну у мікрокапсулах здійснювали методом ультрафіолетової спектрофотометрії на приладі SCANSPEC SP110070 (SCANSCI). Для аналізу 3 мг порошку мікрокапсул розчиняли у 3 мл дистильованої води, після чого реєстрували спектри поглинання в діапазоні УФ-випромінювання. [94]

Максимуми поглинання становили: для вітаміну B₁₂ – $\lambda = 361,4$ нм.

Побудовано калібрувальну криву для вітаміну з високим коефіцієнтом кореляції ($R = 0.985$). Межі виявлення становили 0.006 г/л для B₁₂.

Таким чином, встановлено, що поверхнева структура капсул (визначена методом SEM) тісно пов'язана з кінетикою вивільнення вітамінів: шорстка поверхня хітозанових частинок зумовлює повільне дифузійне вивільнення, а гладка — швидке розчинення і негайне вивільнення активної речовини. [94]

Визначення вмісту вологи методом Карла Фішера

Використовують Coulometric Karl Fischer titrator. Желатинові капсули відкривають та зважують 2 г мікрокапсул. Вносять пробу в комірку титратора та титрують до кінцевої точки, фіксується вміст води в субстанції. Вміст води повинен становити не більше 5%. [108]

РОЗДІЛ 8. Проєкт заявки на корисну модель

СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ВІТАМІНУ В₁₂ (ЦІАНКОБАЛАМІНУ)

Корисна модель належить до галузі промислової та фармацевтичної біотехнології, зокрема до технологічних процесів мікробіологічного синтезу і очищення вітаміну В₁₂, та може бути використана у виробництві вітамінних препаратів, фармацевтичних субстанцій і харчових добавок із підвищеною чистотою продукту.

Задачею корисної моделі є вдосконалення способу біотехнологічного одержання вітаміну В₁₂, що дозволяє:

- підвищити чистоту продукту до $\geq 98\%$;
- скоротити тривалість стадії очищення;

Способі одержання вітаміну В₁₂, який включає стадії ферментації мікроорганізмів, центрифугування культуральної рідини, ціанування та очищення продукту, згідно з корисною моделлю:

- ціанування проводять у стерильному середовищі розчином KCN концентрацією 0,1 М при рН 7,5–8,0 і температурі 25–30 °С протягом 40 хв;
- очищення здійснюють на комбінованих колонках зі смолою Amberlite, що має гідрофобну та іонообмінну активність;

Таке поєднання умов забезпечує збільшення виходу активної форми вітаміну на 20–25%, зниження використання ціаніду у 5 разів та скорочення тривалості процесу на 25 % порівняно з відомими методами.

1. Ферментацію проводять штамом *Bifidobacterium longum* ВВ68 у живильному середовищі МПА при температурі 37 °С протягом 24 год.
2. Після закінчення ферментації біомасу центрифугують.

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.04 КР ПЗ</i>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 8. Проєкт заявки на корисну модель	Літ.	Арк.	Аркушів
Разробив	Бережна А.С.						87	104
Перевірів	Старовойтова С.О.							
Реценз.								87
Н. Контр.							<i>Кафедра БТМ</i>	
Затверд.	Стабніков В.П.							

3. Після біомасу піддають лізису при температурі 80–120 °С та рН 6,5–8,5 протягом 10–30 хвилин.

4. Лізат фільтрують для відділення механічних включень. Отримують прозорий розчин, збагачений кориноїдами.

5. Адсорбція на гідрофобній смолі для вилучення кориноїдів з розчину. Смола забезпечує концентрування та попереднє очищення.

6. До отриманого розчину додають стерильний розчин KCN 0,1 М, підтримуючи рН $7,8 \pm 0,2$ та температуру 28 °С протягом 40 хв.

7. Після ціанування розчин фільтрують і пропускають через колонку зі смолою Amberlite IRA.

8. Кристалізацію цанкобаламіну здійснюють шляхом додавання ацетону до концентрації 70 %, осад відділяють, сушать при 40 °С у вакуумі.

Переваги способу

- Зниження використання ціаніду з 0,5 М до 0,1 М без втрати ефективності.
- Можливість повторного використання смоли до 5 циклів.
- Висока чистота кінцевого продукту без додаткової фільтрації.
- Економія реагентів та енергоресурсів.

Формула корисної моделі

Спосіб одержання вітаміну В₁₂ (ціанкобаламіну), який включає стадії ферментації мікроорганізмів, центрифугування культуральної рідини, лізис, мікрофільтрацію, ціанування та очищення продукту, який відрізняється тим, що ціанування проводять у стерильному середовищі розчином KCN концентрацією 0,1 М при рН 7,5–8,0 і температурі 25–30 °С протягом 40 хв, а очищення здійснюють на комбінованій колонці зі смолою Amberlite, що має гідрофобну та іонообмінну активність.

Реферат

Спосіб одержання вітаміну В₁₂ (ціанкобаламіну) належить до галузі фармацевтичної біотехнології. Спосіб включає ферментацію мікроорганізмів,

центрифугування, лізис, мікрофільтрацію, ціанування, очищення на смолі Amberlite та кристалізацію продукту. Ціанування проводять розчином KCN 0,1 М при рН 7,5–8,0 і температурі 25–30 °С, очищення — на іонообмінній смолі Amberlite з можливістю регенерації. Результатом є підвищення чистоти вітаміну до ≥ 98 %, скорочення тривалості процесу та зменшення кількості токсичних відходів.

Висновки

При виконанні роботи було проведено аналіз наукової літератури на тему «Метаболіти бактерій роду *Bifidobacterium* для фармацевтичної промисловості».

Було досліджено виробництво вітаміну В₁₂ бактерією *B. longum BB68* який синтезує 142,57 мкг/мл вітаміну протягом 24 год. Та переваги отримання вітаміну біотехнологічним шляхом.

Проаналізовано технологію виробництва вітаміну В₁₂, що включає: виділення та очищення культуральної рідини, виробництво готового лікарського засобу, підбір технологічного обладнання.

Та було підібрано відповідні методики контролю готового продукту та субстанції, що включає методи кількісного визначення, ідентифікації за допомогою УФ-спектрофотометрії, ІЧ-спектрофотометрії та використовуючи специфічні якісні реакції, визначення вмісту води в субстанції та готовому продукті, визначення супровідних домішок методом тонкошарової хроматографії та рідинної хроматографії.

Результат роботи свідчить про перевагу отримання вітаміну В₁₂ біотехнологічним методом в порівнянні з синтетичним.

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.04 КР ПЗ</i>					
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>Висновки</i>					
<i>Разробив</i>	<i>Бережна А.С.</i>							<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевірів</i>	<i>Старовойтова С.О.</i>								90	104
<i>Реценз.</i>								90		
<i>Н. Контр.</i>								<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>									

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Schöpping, M., Gaspar, P., Neves, A.R. *et al.* Identifying the essential nutritional requirements of the probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium longum* through genome-scale modeling. *npj Syst Biol Appl* **7**, 47 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41540-021-00207-4>
2. Rivière, A., Selak, M., Lantin, D., Leroy, F., & De Vuyst, L. (2016). *Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut*. *Frontiers in Microbiology*, *7*. doi:10.3389/fmicb.2016.00979
3. María Chávarri ^a, Lucía Diez-Gutiérrez , Izaskun Marañón , Luis Javier R. Barron. Chapter 17 - Secondary Metabolites From Probiotic Metabolism. *Advances in Probiotics Microorganisms in Food and Health*, 2021, Pages 259-276. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822909-5.00017-4>
4. Priyamvada Thorakkattu, Anandu Chandra Khanashyam, Kartik Shah, Karthik Sajith Babu, Anjaly Shanker Mundanat, Anjaly Shanker Mundanat, Aiswariya Deliephan, Gitanjali S. Deokar, Chalath Santivarangkna and Nilesh Prakash Nirmal. Postbiotics: Current Trends in Food and Pharmaceutical Industry. *Foods* 2022, *11*(19), 3094; <https://doi.org/10.3390/foods11193094>
5. Victor E. Vera-Santander, Ricardo H. Hernández-Figueroa, María T. Jiménez-Munguía, Emma Mani-López and Aurelio López-Malo. Health Benefits of Consuming Foods with Bacterial Probiotics, Postbiotics, and Their Metabolites: A Review. *Molecules* 2023, *28*(3), 1230; <https://doi.org/10.3390/molecules28031230>
6. Nataraj, B.H., Ali, S.A., Behare, P.V. *et al.* Postbiotics-parabiotics: the new horizons in microbial biotherapy and functional foods. *Microb Cell Fact* *19*, 168 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01426-w>
7. Erginkaya, Z.; Konuray-Altun, G. Potential Biotherapeutic Properties of Lactic Acid Bacteria in Foods. *Food Biosci.* 2022, *46*, 101544.2022. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101544>

8. Aguilar-Toalá, J.E.; Garcia-Varela, R.; Garcia, H.S.; Mata-Haro, V.; González-Córdova, A.F.; Vallejo-Cordoba, B.; Hernández-Mendoza, A. Postbiotics: An Evolving Term within the Functional Foods Field. *Trends Food Sci. Technol.* 2018, 75, 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.009>
9. Hernández-Granados, M.J.; Franco-Robles, E. Postbiotics in Human Health: Possible New Functional Ingredients? *Food Res. Int.* 2020, 137, 109660. [10.1016/j.foodres.2020.109660](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109660)
10. Morrison, D.J.; Preston, T. Formation of Short Chain Fatty Acids by the Gut Microbiota and Their Impact on Human Metabolism. *Gut Microbes* 2016, 7, 189–200. [10.1080/19490976.2015.1134082](https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1134082)
11. Gill, P.A.; van Zelm, M.C.; Muir, J.G.; Gibson, P.R. Review Article: Short Chain Fatty Acids as Potential Therapeutic Agents in Human Gastrointestinal and Inflammatory Disorders. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2018, 48, 15–34. [10.1111/apt.14689](https://doi.org/10.1111/apt.14689)
12. LeBlanc, J.G., Chain, F., Martín, R. *et al.* Beneficial effects on host energy metabolism of short-chain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria. *Microb Cell Fact* 16, 79 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0691-z>
13. Chaisuwan, W.; Jantanasakulwong, K.; Wangtueai, S.; Phimolsiripol, Y.; Chaiyaso, T.; Techapun, C.; Phongthai, S.; You, S.; Regenstein, J.M.; Seesuriyachan, P. Microbial exopolysaccharides for immune enhancement: Fermentation, modifications and bioactivities. *Food Biosci.* 2020, 35, 100564. [10.1016/j.fbio.2020.100564](https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100564)
14. Gezginç, Y.; Karabekmez-Erdem, T.; Tatar, H.D.; Ayman, S.; Ganiyusufoglu, E.; Dayisoğlu, K.S. Health promoting benefits of postbiotics produced by lactic acid bacteria: Exopolysaccharide. *Biotech. Stud.* 2022, 31, 61–70. <https://doi.org/10.38042/biotechstudies.1159166>
15. Singhania, R.R.; Patel, A.K.; Saini, R.; Pandey, A. Industrial Enzymes. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*; Pandey, A.,

- Rainer, H., Mohammad, T., Madhavan, N., Larroche, C., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2017; pp. 103–125.
16. Kumar, V.; Baweja, M.; Liu, H.; Shukla, P. Microbial enzyme engineering: Applications and perspectives. In *Recent Advances in Applied Microbiology*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2017; pp. 259–273. [10.1007/978-981-10-5275-0_13](https://doi.org/10.1007/978-981-10-5275-0_13)
 17. Usta-Gorgun, B., & Yilmaz-Ersan, L. (2020). *Short-chain fatty acid production by the Bifidobacterium species in the presence of salep*. *Electronic Journal of Biotechnology*. doi:10.1016/j.ejbt.2020.06.004
 18. Kelly S. M., Munoz-Munoz J., van Sinderen D. Plant Glycan Metabolism by Bifidobacteria. *Frontiers in Microbiology*. 2021. Vol. 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.609418>
 19. Di Yu, Zhangming Pei, Yutao Chen, Hongchao Wang, Yue Xiao, Hao Zhang, Wei Chen, Wenwei Lu. *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* as widespread bacteriocin gene clusters carrier stands out among the *Bifidobacterium* / D. Yu et al. *Applied and Environmental Microbiology*. 2023. <https://doi.org/10.1128/aem.00979-23>
 20. Kelly SM, Munoz-Munoz J and van Sinderen D (2021) Plant Glycan Metabolism by Bifidobacteria. *Front. Microbiol.* 12:609418. doi: 10.3389/fmicb.2021.609418
 21. Amiri, S., Mokarram, R. R., Khiabani, M. S., Bari, M. R., & Khaledabad, M. A. (2020). *In situ production of conjugated linoleic acid by Bifidobacterium lactis BB12 and Lactobacillus acidophilus LA5 in milk model medium*. *LWT*, 109933. doi:10.1016/j.lwt.2020.109933
 22. Yang, B., Chen, H., Gao, H., Wang, J., Stanton, C., Ross, R. P., ... Chen, W. (2018). *Bifidobacterium breve CCFM683 could ameliorate DSS-induced colitis in mice primarily via conjugated linoleic acid production and gut microbiota modulation*. *Journal of Functional Foods*, 49, 61–72. doi:10.1016/j.jff.2018.08.014

23. Bingyong Mao, Weiling Guo, Zhouqun Huang, Xin Tang, Qiuxiang Zhang, Bo Yang, Jianxin Zhao, Shumao Cui, Hao Zhang, *Production of conjugated fatty acids in probiotic-fermented walnut milk with the addition of lipase*, *LWT*, Volume 172, 2022, 114204, ISSN 0023-6438, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114204>.
24. Ruiz-Aceituno, L., Esteban-Torres, M., James, K., Moreno, F. J., & van Sinderen, D. (2019). *Metabolism of biosynthetic oligosaccharides by human-derived Bifidobacterium breve UCC2003 and Bifidobacterium longum NCIMB 8809*. *International Journal of Food Microbiology*, 108476. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108476
25. Manome, A., Abiko, Y., Kawashima, J., Washio, J., Fukumoto, S., & Takahashi, N. (2019). *Acidogenic Potential of Oral Bifidobacterium and Its High Fluoride Tolerance*. *Frontiers in Microbiology*, 10. doi:10.3389/fmicb.2019.01099
26. Altmann, F., Kosma, P., O'Callaghan, A., Leahy, S., Bottacini, F., Molloy, E., ... O'Mahony, L. (2016). *Genome Analysis and Characterisation of the Exopolysaccharide Produced by Bifidobacterium longum subsp. longum 35624™*. *PLOS ONE*, 11(9), e0162983. doi:10.1371/journal.pone.0162983
27. Menezes, F. N. D. D., Melo, F. H. C., Vieira, A. R. S., Almeida, É. T. C., Lima, M. S., Aquino, J. S., ... Souza, E. L. (2020). *Acerola (Malpighia glabra L.) and guava (Psidium guayaba L.) industrial processing by-products stimulate probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium growth and induce beneficial changes in colonic microbiota*. *Journal of Applied Microbiology*, 130(4), 1323–1336. doi:10.1111/jam.14824
28. Boontun, C., Vatanyoopaisarn, S., Hankla, S., Kuraya, E., & Tamaki, Y. (2021). *Modification of media using food-grade components for the fermentation of Bifidobacterium and Lactobacillus strains in large-scale bioreactors*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 1–11. doi:10.1080/10826068.2020.1861009

29. *Probiotic potential of a novel exopolysaccharide produced by Bifidobacterium animalis subsp. Lactis SF* / H. Lv et al. *LWT*. 2024. P. 115764. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.115764>
30. Li, S., Huang, R., Shah, N. P., Tao, X., Xiong, Y., & Wei, H. (2014). *Antioxidant and antibacterial activities of exopolysaccharides from Bifidobacterium bifidum WBIN03 and Lactobacillus plantarum R315*. *Journal of Dairy Science*, 97(12), 7334–7343. doi:10.3168/jds.2014-7912
31. Ana Solopova, Francesca Bottacini, Elena Venturi degli Esposti, Alberto Amaretti, Stefano Raimondi, Maddalena Rossi, Douwe van Sinderen. Riboflavin Biosynthesis and Overproduction by a Derivative of the Human Gut Commensal *Bifidobacterium longum subsp. infantis* ATCC 15697 / *Frontiers in Microbiology*. 2020. Vol. 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.573335>
32. Jia Yin, Xiaoxia Peng, Aijun Yang, Mudi Lin, Kunfa Ji, Xiaohui Dai, Juan Huang, Li Li, Like Feng. *Impact of oligosaccharides on probiotic properties and B vitamins production: a comprehensive assessment of probiotic strains* / *International Journal of Food Science & Technology*. 2024. URL: <https://doi.org/10.1111/ijfs.17328>
33. Merle Rätsep, Kalle Kilk, Mihkel Zilmer, Liina Kuus, Epp Songisepp. *A Novel Bifidobacterium longum ssp. longum Strain with Pleiotropic Effects* / *Microorganisms*. 2024. Vol. 12, no. 1. P. 174. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12010174>
34. Fushinobu S., Abou Hachem M. Structure and evolution of the bifidobacterial carbohydrate metabolism proteins and enzymes. *Biochemical Society Transactions*. 2021. Vol. 49, no. 2. P. 563–578. <https://doi.org/10.1042/bst20200163>
35. Akira Sen, Keisuke Yoshida, Yasuko Yoneda, Takane Katayama, Tatsuki Nishimura, Aina Gotoh, Toyoyuki Hashimoto, Toshitaka Odamaki, Shin Yoshimoto, Toshihiko Katoh, Jin-Zhong Xiao. *Comprehensive analysis of metabolites produced by co-cultivation of Bifidobacterium breve MCC1274 with*

- human iPSC-derived intestinal epithelial cells. Frontiers in Microbiology. 2023. Vol. 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1155438>*
36. Kailong Liu, Tian Huang, Guoqiang Yao, Lai-Yu Kwok, Zhan Yang, Heping Zhang. Untargeted metabolomic analysis uncovers metabolic variability of four Bifidobacterial strains for probiotic development *Frontiers in Microbiology. 2025. Vol. 16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1522036>*
37. Nataraj, B.H.; Ali, S.A.; Behare, P.V.; Yadav, H. Postbiotics-Parabiotics: The New Horizons in Microbial Biotherapy and Functional Foods. *Microb. Cell Factories* 2020, 19, 168. <https://link.springer.com/article/10.1186/s12934-020-01426-w>
38. Roel Van der Meulen, Tom Adriany, Kristof Verbrugghe, Luc De Vuyst *Kinetic Analysis of Bifidobacterial Metabolism Reveals a Minor Role for Succinic Acid in the Regeneration of NAD+ through Its Growth-Associated Production. Applied and Environmental Microbiology. 2016. Vol. 72, no. 8. P. 5204–5210.*
39. Yanyan Wang, Linxia Liu, Zhaoxia Jin, Dawei Zhang. Microbial Cell Factories for Green Production of Vitamins. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2021. Vol. 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.661562>*
40. 2000: Vitamin B2 shifts from chemical synthesis to exclusive biotechnological production in less than 15 years [Електронний ресурс].Режим доступу: <https://www.europabio.org/timeline/2000/>
41. Ринок дієтичних добавок в Україні: аналіз аптечного продажу за підсумками 2020 р. [Електронний ресурс].Режим доступу: <https://www.apteka.ua/article/589026>
42. Вітаміни та мінерали - Україна [Електронний ресурс].Режим доступу: <https://www.statista.com/outlook/emo/otc-pharmaceuticals/vitamins-minerals/ukraine>
43. Horodetska I. Y., Blavatska O. B. Research of the current state of the vitaminary preparations market in Ukraine. *Farmatsevtichnyi zhurnal. 2019. No. 5. P. 3–11. <https://doi.org/10.32352/0367-3057.5.19.01>*

44. КИЇВСЬКИЙ ВІТАМІННИЙ ЗАВОД [Електронний ресурс].Режим доступу: <https://www.vitamin.com.ua/en/catalog/>
- 45.Вітамін В12 допомагає при стресі? Як він впливає на нервову систему? [Електронний ресурс].Режим доступу: https://allnutrition.ua/blog-12/vitamin_v12_dopomahaie_pry_stresi_yak_vin_vplyvaie_na_nervovu_systemu-blog4443.html
- 46.Детально про вітамін В12 [Електронний ресурс].Режим доступу: <https://top-spirulina.com.ua/blog/vitamin-b12-ili-kobalamin/>
- 47.Intestinal Bacteria as a Vitamin B12 Source [Електронний ресурс].Режим доступу: <https://veganhealth.org/vitamin-b12/intestinal-bacteria-as-b12-source/>
- 48.Клінічне значення вітаміну В12 (ціанокобаламіну). Підбірка наукових праць. Ukrainian Medical Journal. 2024. Т. 166, № 8. <https://doi.org/10.32471/umj.1680-3051.166.259948>
- 49.Причини та ознаки дефіциту вітаміну В12 в організмі [Електронний ресурс].Режим доступу: <https://www.bsmu.edu.ua/blog/prychyny-ta-oznaky-deficytu-vitaminu-v12-v-organizmi/>
- 50.Tindjau R., Chua J.-Y., Liu S.-Q. Co-culturing *Propionibacterium freudenreichii* and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* improves short-chain fatty acids and vitamin B12 contents in soy whey. *Food Microbiology*. 2024. P. 104525. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2024.104525>
51. D. Ramírez-Rendon (2022) Impact of novel microbial secondary metabolites on the pharma industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 106 (5-6). 1855–1878. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11821-5>
- 52.J. L. N. Dinglasan (2025) Microbial secondary metabolites: advancements to accelerate discovery towards application. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/s41579-024-01141-y>
- 53.MedParkHospital Vitamin B12 [Електронний].Режим доступу: <https://www.medparkhospital.com/en-US/lifestyles/vitamin-b12>

54. Chemical Book Vitamin B12 [Електронний]. Режим доступу: https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB6126463.htm
55. Вітамін B12 (кобаламін) структурна формула [Електронний]. Режим доступу: <https://depositphotos.com/ua/vector/vitamin-b12-cobalamin-structural-formula-13283549.html>
56. Foods-Body Вітамін B12 – користь для здоров'я людини! [Електронний]. Режим доступу: <https://foods-body.ua/ua/articles/vitaminy/vitamin-b12/>
57. МОЗ Що треба знати про вітамін B12 [Електронний]. Режим доступу: <https://moz.gov.ua/uk/scho-treba-znati-pro-vitamin-b12>
58. Особливості використання вітаміну B12 у тваринництві [Електронний]. Режим доступу: <https://kreon-d.com.ua/ua/a456741-osobennosti-ispolzovaniya-vitamina.html>
59. МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ наказ 16.07.2020 № 1613 [Електронний]. Режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0891-20#Text>
60. Вітамін B12 [Електронний]. Режим доступу: https://apteka911.ua/ua/shop/lekarstvennyie-preparaty/vitamin_b12
61. Всесвітня організація охорони здоров'я [Електронний]. Режим доступу: https://www.who.int/czechia/news/item/24-02-2025-three-years-of-war-rising-demand-for-mental-health-support-trauma-care-and-rehabilitation?utm_source=chatgpt.com
62. Уніан інформаційне агенство [Електронний]. Режим доступу: <https://www.unian.ua/society/naselennya-ukrajini-skilki-lyudey-prozhivaye-v-krajini-v-2024-roci-12865014.html>
63. Неовітам таблетки №30 Київський вітамінний завод ПАТ (Україна, Київ) [Електронний]. Режим доступу: <https://www.add.ua/ua/neovitam-n30-tabletki.html>
64. Jia Yin, Xiaoxia Peng, Aijun Yang, Mudi Lin, Kunfa Ji, Xiaohui Dai, Juan Huang, Li Li, Like Feng. Impact of oligosaccharides on probiotic properties and

- B vitamins production: a comprehensive assessment of probiotic strains / International Journal of Food Science & Technology. 2024. <https://doi.org/10.1111/ijfs.17328>
65. Calvillo, Á., Pellicer, T., Carnicer, M., Planas, A. (2022). Bioprocess Strategies for Vitamin B12 Production by Microbial Fermentation and Its Market Applications. *Bioengineering*, 9(8), 365. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9080365>
66. Tan, C. H. (2021). Recent progress in harvest and recovery techniques of mammalian and algae cells for industries. *Indian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s12088-021-00930-w>
67. Onyshchuk, O. (2023). To the study of the flocculation and coagulation process in the purification of water for industrial application. *Herald of Khmelnytskyi National University. Technical Sciences*, 317(1), 151–154. <https://doi.org/10.31891/2307-5732-2023-317-1-151-154>
68. Hou, S., et al. (2023). Sedimentation-based separation and purification of solid industrial waste: A case study of phosphogypsum. *ACS Omega*. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c05351>
69. Nemer, G., et al. (2021). Mechanical cell disruption technologies for the extraction of dyes and pigments from microorganisms: A review. *Fermentation*, 7(1), 36. <https://doi.org/10.3390/fermentation7010036>
70. DOWNSTREAM PROCESSING IN BIOPROCESS OPERATIONS: 2023 [Электронный]. Режим доступа: https://iipseries.org/assets/docupload/rsl2024AD47BC867F657A7.pdf?utm_source=chatgpt.com
71. Alkhaldi, H., et al. (2024). Sustainable polymeric adsorbents for adsorption-based water remediation and pathogen deactivation: a review. *RSC Advances*, 14(45), 33143–33190. <https://doi.org/10.1039/d4ra05269b>
72. Toxicological Profile for Cyanide, Draft for Public Comment [Электронный]. Режим доступа: https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp8.pdf?utm_source=chatgpt.com

73. Evaluation Report on the Analytical Methods submitted in connection with the Application for Authorisation of a Feed Additive according to Regulation [Електронний]. Режим доступу: https://joint-research-centre.ec.europa.eu/system/files/2022-07/finrep_fad-2021-0041_vitb12-cyanocobalamin.pdf?utm_source=chatgpt.com
74. Adsorption order of ion exchange resin [Електронний]. Режим доступу: <https://www.cnumekresin.com/info/adsorption-order-of-ion-exchange-resin-102776468.html>
75. Wiedemair, M., et al. (2022). Solution, crystal and in-silico structures of the organometallic vitamin B12-derivative acetylcobalamin and of its novel rhodium-analogue acetylrhodibalamin. *Helvetica Chimica Acta*. <https://doi.org/10.1002/hlca.202200158>
76. Temova Rakuša, Ž., et al. (2022). Vitamin B12 in foods, food supplements, and medicines – A review of its role and properties with a focus on its stability. *Molecules*, 28(1), 240. <https://doi.org/10.3390/molecules28010240>
77. A kind of preparation method of vitamin B12 crude product [Електронний]. Режим доступу: <https://patentimages.storage.googleapis.com/57/a5/b2/c0309a7480eb5f/CN111808158A.pdf>
78. Резервуари для зберігання рідини [Електронний]. Режим доступу: https://www.alibaba.com/product-detail/4000-L-Liquid-10l-500l-Water_1601438307835.html?spm=a2700.7724857.0.0.437d201aBgKttK
79. Відцентровий насос Alfa Laval LKH [Електронний]. Режим доступу: <https://www.alfalaval.ua/products/fluid-handling/pumps/centrifugal-pumps/lkh/>
80. Allied Industrial Dynamics (серія GX3) [Електронний]. Режим доступу: https://www.alliedindyn.com/separationequipment?utm_source=chatgpt.com
81. Реактор 4000 л з подвійною сорочкою [Електронний]. Режим доступу: https://www.alibaba.com/product-detail/3000L-Stirred-Homogenizer-Reactor-Double-Jacketed_1601268928009.html?utm_source=chatgpt.com

82. Мікрофільтраційна установка Модель HC-10X/серія для MF/UF [Електронний].Режим доступу: https://doupufiltration.en.made-in-china.com/product/gZvGNtFDfcTk/China-2000L-H-Continuous-Microfiltration-System-for-Milk-Defat.html?utm_source=chatgpt.com
83. ProMinent DULCOFLEX DFYa [Електронний].Режим доступу: https://www.anchorpumps.com/prominent-dulcoflex-dfya-peristaltic-metering-pump-410-l-hr?utm_source=chatgpt.com
84. Реактор-змішувач [Електронний].Режим доступу: https://www.alibaba.com/product-detail/1000l-Continuous-Stirred-tank-Reactor-Cstr_62287370627.html?utm_source=chatgpt.com
85. Refillable resin columns [Електронний].Режим доступу: https://www.sentry-equip.com/products-services/accessories/sampling-accessories/refillable-resin-columns?utm_source=chatgpt.com
86. Stainless Steel Industrial Crystallization Tank, Evaporative Crystallizer, Vacuum Crystallizer [Електронний].Режим доступу: https://wuxizhanghua.en.made-in-china.com/product/SdMnqLAuZgVe/China-Stainless-Steel-Industrial-Crystallization-Tank-Evaporative-Crystallizer-Vacuum-Crystallizer.html?utm_source=chatgpt.com
87. AmberLite™ XAD™16HP N Polymeric Adsorbent [Електронний].Режим доступу: https://www.lenntech.com/Data-sheets/DuPont-Amberlite-XAD-16HP-N-Polymeric-Adsorbent-L.pdf?utm_source=chatgpt.com
88. Реактор 1 м³ AISI 304 [Електронний].Режим доступу: <https://wise-master.com.ua/ua/p1001183919-reaktor-aisi-304.html>
89. Реактор 6м³ [Електронний].Режим доступу: <https://promwestgrupp.uaprom.net/ua/p637928724-reaktor-emalirovannyj-himicheskij.html>
90. Product Data Sheet DIAION™ HP20 [Електронний]. Режим доступу: https://www.diaion.com/en/products/synthetic_adsorbents/data_sheet_hp/pdf/hp20.pdf

91. Process for the purification of methylcobalamin. (2018). WO 2018/007035 A1. <https://patents.google.com/patent/WO2018007035A1/en>
92. Crystallization method of vitamin B12 crystal and product thereof (2021). CN114149477B. <https://patents.google.com/patent/CN114149477B/en>
93. Levano, K.J.M., et al. (2025). *Spray drying vitamin B12: Innovations in encapsulation for global health*. Journal of Food Engineering, S0924-2244 (25), Article 4522. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2025.4522>
94. Berta N. Estevinho, Ioana Carlan, Alexandra Blaga, Fernando Rocha, Soluble vitamins (vitamin B12 and vitamin C) microencapsulated with different biopolymers by a spray drying process (2015), Powder Technology doi: 10.1016/j.powtec.2015.11.019
95. Choudhury, N., Meghwal, M., & Das, K. (2021). *Microencapsulation: An overview on concepts, methods, properties and applications in foods*. Food Frontiers, 2(4), 426–442. <https://doi.org/10.1002/fft2.94>
[ResearchGate+2agris.fao.org+2](https://www.researchgate.net/publication/354149477)
96. Mehta, N., Kumar, P., Verma, A.K., Umaraw, P., Kumar, Y., Malav, O.P., Sazili, A.Q., Domínguez, R., & Lorenzo, J.M. (2022). *Microencapsulation as a Noble Technique for the Application of Bioactive Compounds in the Food Industry: A Comprehensive Review*. Applied Sciences, 12(3), 1424. <https://doi.org/10.3390/app12031424>
97. 1000 L Stainless Steel Steam Heating Hydrogenation Autoclave Reactor [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://www.alibaba.com/product-detail/1000L-Stainless-Steel-Steam-Heating-Hydrogenation_1600128263917.html?utm_source=chatgpt.com
98. Rudert Edelstahl [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://www.foeth.com/en/reactors/stainless-steel-reactors/rudert-edelstahl-technik-reaktor-10m3-stainless-steel-reactor-r1336/?utm_source=chatgpt.com
99. Насос відцентровий [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://sigma.ua/buy/nasos-tsentrobezchnyy-0-6kvt-hmax-27m-qmax-90l-min->

- [leo-3-0-775262/?srsltid=afmbooqrtybi7un36ht_qkg9alrwo3u1cvqz5eir4liqvirlazi1bflk](#)
100. Реактор 10 м³ [Электронный ресурс] // Режим доступа: https://sinotech-technology.en.made-in-china.com/product/DmWryKoTOLRt/China-Stainless-Steel-Bio-Reactor-10000-Litre-Reactor-for-Chemical-Industry.html?utm_source
101. Розпилювальна сушарка RS-010 [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://chumaki.in.ua/ua/p1697673563-sushka-rozpilyuvalna-010.html?srsltid=AfmBOoq3koXxUcv83qXQ3m7JiDuqhjsBtcVaYMsCTQTTfL6k4H2STvNL>
102. Автоматичний капсулятор NJP-800 [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://chumaki.in.ua/ua/p474857088-avtomatichnij-kapsulyator-njp.html>
103. Блістерна пакувальна машина Haizhou Packing DPH-260 [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://surl.li/nnwtii>
104. Картонувальна машина Titration [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://qualipakmachines.com/uk/product/use-automatic-cartoning-machine-for-smooth-packaging/>
105. Japanese Pharmacopoeia. Cyanocobalamin (Vitamin B₁₂) / Official Monographs for Part I // The Japanese Pharmacopoeia. 14th ed. (JP XIV). – Tokyo : Ministry of Health, Labour and Welfare, P. 388.
106. European Pharmacopoeia 10.3 (2021). Monograph 0547: Cyanocobalamin.
107. The International Pharmacopoeia (6th Edition): Cyanocobalamin
108. Water Determination by Karl Fischer Titration [Электронный ресурс] // Режим доступа: <file:///D:/81085089EN.pdf>
109. Process for the purification of methylcobalamin. (2018). WO 2018/007035 A1. <https://patents.google.com/patent/WO2018007035A1/en>
110. HAUS DDI 4742 [Электронный]. Режим доступа: https://sealing.com.ua/ua/separators-and-decanter-centrifuges/dekanteru-haus/haus-ddi-4742-dekanterna-centrifuga/?utm_source=chatgpt.com