

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ ЕКОЛОГІЧНОЇ БЕЗПЕКИ, ІНЖЕНЕРІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЙ
КАФЕДРА БІОТЕХНОЛОГІЇ

ДОПУСТИТИ ДО ЗАХИСТУ
Завідувач випускової кафедри
_____М.М.Барановський
«_____» _____ 2020 р.

ДИПЛОМНА РОБОТА
(ПОЯСНЮВАЛЬНА ЗАПИСКА)
ВИПУСКНИКА ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА
ЗА СПЕЦІАЛЬНІСТЮ 162 «БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА БІОІНЖЕНЕРІЯ»

**Тема: «Удосконалення технології отримання вітаміну В12
(ін'єкційна форма)»**

Виконавець: студентка 201-Мз

Стаховська В. С

Керівник: к. т. н., доцент кафедри біотехнології

Решетняк Л. Р.

Консультант розділу «Охорона праці»:

Павлиш В. Д.

Консультант розділу

«Охорона навколишнього середовища»:

Фролов В.Ф.

Нормоконтролер:

Дражнікова А. В.

КИЇВ 2020

НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет екологічної безпеки, інженерії та технологій

Кафедра біотехнології

Спеціальність: 162 «Біотехнології та біоінженерія»,

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

Барановський М.М. _____

« ____ » _____ 2020 р.

ЗАВДАННЯ

на виконання дипломної роботи

Стаховської Вікторії Сергіївни

1. Тема дипломної роботи «Удосконалення технології отримання вітаміну В12 (ін'єкційна форма)» затверджена наказом ректора від « 15 » _____ вересня _____ 2020 р. № 16571 /ст.

2. Термін виконання роботи: з 5 жовтня 2020 року по 31 грудня 2020 року.

3. Вихідні дані роботи: склад поживного середовища, біологічний абент *Propionibacterium shermanii*, умови біосинтезу вітаміну В12.

4. Зміст пояснювальної записки: РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ; РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ; РОЗДІЛ 3. НАУКОВО-ДОСЛІДНА РОБОТА; РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ; РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА; ВИСНОВКИ; СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.

5. Перелік обов'язкового ілюстративного матеріалу: 10 таблиць, 14 рисунків

6. Календарний план-графік

№	Завдання	Термін виконання	Підпис
1	Пошук літературних джерел за темою дипломної роботи	12.10. – 25.10.2020	
2	Оброблення знайденого літературного матеріалу	26.10. – 01.11.2020	
3	Написання основної частини	02.11 – 15.11.2020	
4	Написання висновків	16.11.2020	
5	Оформлення дипломної роботи	17.11. – 30.11.2020	
6	Перевірка дипломної роботи керівником	01.12.2020	
7	Виправлення виявлених недоліків	02.12. – 14.12.2020	
8	Захист дипломної роботи	24.12.2020	

7. Консультанти з окремих розділів роботи

Розділ	Консультант	Підпис, дата	
		Завдання видав	Завдання прийняв
Охорона праці	Старший викладач Павлиш В.Д.		
Охорона навколишнього середовища	д.т.н, професор Фролов В.Ф.		

8. Дата видачі завдання: «___» _____ 20__ р.

Керівник дипломної роботи: _____ Решетняк Л. Р.

(підпис керівника)

Завдання прийняв до виконання: _____ Стаховська В. С.

(підпис випускника)

РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка до дипломної роботи : «Удосконалення технології отримання вітаміну В12 (ін'єкційна форма)»: 103 с., 12 рис., 10 табл., 87 використаних джерел, 3 додатки.

ВІТАМІН В12, ЦАНОКОБАЛАМІН, ТЕХНОЛОГІЯ, ПОЖИВНЕ СЕРЕДОВИЩЕ, *PROPIONIBACTERIUM SHERMANII*, ІН'ЄКЦІЯ

Об'єкт дослідження – процес виробництва вітаміну В12.

Предмет дослідження – вітамін В12.

Мета роботи – удосконалити технологію отримання вітаміну В12.

Методи дослідження: технологічні, біохімічні, мікробіологічні.

Уперше запропоновано додавати кобальт концентрацією 0,003 г/л в поживне середовище для отримання достатньої кількості живих клітин *P. shermanii*, з метою підвищення вмісту вітаміну В12 в поживному середовищі. Також, з метою оптимізації процесу виробництва вітаміну В12, як у розрізі фінансових витрат, так і у розрізі питання підвищення якості води, запропоновано нову технологію виробництва води для ін'єкцій, в якій окрім процесу дистиляції води, її додатково доочищують комбінованими методами мембранного розділення.

Отримані результати дозволяють використовувати удосконалену технологію отримання вітаміну В12 та очищення води для ін'єкцій на фармацевтичному виробництві та в науково-дослідних лабораторіях.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ.....	6
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	10
1.1. Поняття про вітаміни.....	10
1.1.1. Історія відкриття вітамінів.....	10
1.1.2. Біологічне значення вітамінів.....	12
1.1.3. Класифікація вітамінів.....	20
1.1.4. Номенклатура вітамінів.....	23
1.2. Характеристика вітаміну В12.....	23
1.2.1. Історія відкриття вітаміну В12.....	23
1.2.2. Хімічна структура вітаміну В12.....	25
1.2.3. Значення вітаміну В12.....	28
1.2.4. Джерела надходження до організму вітаміну В12.....	29
1.2.5. Хвороби викликані дефіцитом вітаміну В12.....	30
1.3. Висновки до розділу.....	31
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	32
2.1. Об'єкти досліджень.....	32
2.1.1. Характеристика біологічного агента <i>Propionibacterium shermanii</i>	32
2.1.1.1. Морфолого-культуральні ознаки <i>P. shermanii</i>	34
2.1.1.2. Фізіолого-біохімічні ознаки <i>P. shermanii</i>	36
2.1.2. Поживне середовище та умови культивування <i>P. shermanii</i>	36
2.2. Методи досліджень.....	39
2.2.1. Методи контролю процесу культивування.....	39
2.2.2. Методи виділення чистої культури <i>P. shermanii</i>	43
2.2.3. Визначення біомаси <i>P. shermanii</i>	47
2.2.3.1. Виділення мікроорганізмів центрифугуванням або фільтрацією.....	48

2.2.3.2. Визначення кількості клітин і біомаси нефелометричним методом.....	49
2.3. Висновки до розділу.....	51
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	52
3.1. Підбір оптимального складу поживного середовища для отримання вітаміну В12.....	52
3.2. Технологічна схема отримання вітаміну В12.....	55
3.2.1. Приготування води для ін'єкцій.....	56
3.2.2. Обладнання для одержання води для ін'єкцій.....	58
3.3. Стадія ампулювання.....	62
3.4. Вдосконалена технологія очищення води для ін'єкцій.....	63
3.4.1. Технологічна схема очистки води для ін'єкцій.....	66
3.5. Висновки до розділу.....	68
РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ.....	70
4.1. Небезпечні шкідливі виробничі фактори при отриманні вітаміну В12 (ін'єкційна форма).....	72
4.2. Технічні та організаційні заходи для зменшення рівня впливу небезпечних та шкідливих виробничих факторів при отриманні вітаміну В12 (ін'єкційна форма)....	80
4.3. Забезпечення пожежної та вибухової безпеки при отримання вітаміну В12 (ін'єкційна форма).....	80
РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА.....	83
5.1. Класифікація фармацевтичних відходів.....	85
5.2. Забруднення стічних вод відходами фармацевтичного виробництва.....	86
5.2.1. Методи очищення води від фармацевтичних сполук.....	87
5.2.2. Технологічна схема очищення фармацевтичних стоків.....	89
5.3. Метод активного окиснювання для очищення стічних вод при отриманні вітаміну В12.....	89
5.4. Висновки до розділу.....	93
ВИСНОВКИ.....	95
СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	96

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ

rH_2 – окисно-відновлюваний потенціал

КУО – колонієутворюючі одиниці

ДМБ – диметилбензimidазол

МТД – нормативно-технічні документи

ТГФ – тетрагідрофолат

ЧК – чиста культура

ВМП – вироби медичного призначення

ЛЗ – лікарський засіб

МР – матеріальні ресурси

ФП – фармацевтичне підприємство

ЛКЗ – лікувальнокосметичні засоби

ПФП – парафармацевтична продукція

GMP – належна виробнича практика (Good Manufacturing Practice)

ВСТУП

Актуальність теми. Вітаміни відіграють в житті людини величезну роль, будучи незамінними факторами харчування. Вони необхідні для всіх систем нашого організму. Вітаміни групи В активують білковий, жировий і вуглеводний обмін, тим самим беручи участь в кровотворенні і нормальному функціонуванні нервової тканини [1].

Вітамін В12 – складне неолімерних з'єднання, що містить мікроелемент кобальт, який важливий для життєдіяльності організму людини. Вітамін В12 має величезне значення в медицині і представлений декількома спорідненими сполуками, однак, як правило, під вітаміном В12 мають на увазі ціанокобаламін. В даний час широко вивчені властивості і функції вітаміну В12, але ціанокобаламін, його метаболіти та їх аналоги продовжують привертати увагу хіміків, біохіміків і медиків. Також досліджені етіологія і патогенез вітамін-В12-дефіцитної анемії (пернициозної анемії) і розроблена терапія цього захворювання [2].

У роботі наведені основні властивості, функції вітаміну В12 і характеристика різних штамів мікроорганізмів, які є продуцентами при його біосинтезі. Вдосконалено діючу технологію отримання вітаміну В12, який, в умовах конкуренції, є більш економічно вигідний, бажаної якості та гарантовано безпечний для споживачів

З огляду на те, що в умовах постійного росту рівня конкуренції у сфері фармацевтичного виробництва, зумовленого глобалізацією світового ринку фармацевтичних препаратів, необхідно постійно вдосконалювати технології виробництва. Одним з основних критеріїв, як було сказано вище, є економічна доцільність та покращення якості, тому, необхідно вдосконалити технологію очищення води для виробництва вітаміну В12 у формі ін'єкцій, яка б дозволила зменшити фінансові витрати на отримання очищеної води та підвищення її кінцевої якості.

Метою роботи – вдосконалення технології отримання вітаміну В12.

Завдання дипломної роботи:

1. Проаналізувати діючу технологію виробництва вітаміну В12;
2. Запропонувати оптимальне поживне середовище для процесу ферментації;

3. Вдосконалити технологію очистки води для ін'єкцій;

Об'єкт дослідження – процес технологічного виробництва вітаміну В12.

Предмет дослідження – вітамін В12.

Методи дослідження: технологічні, біохімічні, мікробіологічні.

Наукова новизна роботи: Уперше запропоновано додавати кобальт концентрацією 0,003 г/л в поживне середовище для отримання достатньої кількості живих клітин *P. shermanii*, з метою підвищення вмісту вітаміну В12 в поживному середовищі. Також, з метою оптимізації процесу виробництва вітаміну В12, як у розрізі фінансових витрат, так і у розрізі питання підвищення якості води, запропоновано нову технологію виробництва води для ін'єкцій, в якій окрім процесу дистиляції води, її додатково доочищують комбінованими методами мембранного розділення.

Практична значимість. Отримані результати дозволяють використовувати удосконалену технологію отримання вітаміну В12 та очищення води для ін'єкцій на фармацевтичному виробництві та в науково-дослідних лабораторіях.

Апробація отриманих результатів. За матеріалами дипломної роботи опубліковано сагття та тези:

1. Стаховська В.С. Вплив вітаміну D на здатність організму протистояти COVID-19 /В.С. Стаховська, Л.Р. Решетняк, // Science and education: problems, prospects and innovations. Abstracts of the 3rd International scientific and practical conference. CPN Publishing Group. Kyoto, Japan. 2020. Pp. 603-607.

2. Стаховська В.С., Решетняк Л.Р. Удосконалення технології очищення води для ін'єкцій // Modern science: problems and innovations. Abstracts of the 10th International scientific and practical conference. SSPG Publish. Stockholm, Sweden. 2020. Pp. 138-141.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика вітамінів

Вітаміни (лат. *vita* — «життя» + *aminus* — тобто «азотвмісні речовини», необхідні для життя) — низькомолекулярні органічні речовини різноманітної хімічної структури, які є біологічними каталізаторами хімічних реакцій, що проходять у живій клітині, необхідні для нормального обміну речовин і життєдіяльності організму [1].

1.1.1. Історія відкриття вітамінів

У Стародавньому світі і в середні віки інтерес до невидимих або штучно створених речовин, здатних зцілити людину, був традиційно високий: алхімія прагнула знайти панацею - ліки від всіх хвороб, шумери, єгиптяни, слов'яни, греки і римляни лікувалися травами.

У стародавніх працях описано безліч людських хвороб, які, як ми знаємо сьогодні, виникають від нестачі вітамінів. Військові походи всіх часів були затьмарені не тільки жахами боїв, але і жорстоким дією цинги. Вона була зловісним супутником морських мандрівників: моряки при достатніх запасах продовольства були довгий час позбавлені свіжих фруктів, овочів і свіжого м'яса (воно зазвичай замінювалося солониною).

Лише в середині XVIII століття шотландець Джеймс Лінд з'ясував, що, змінивши корабельний раціон, можна перемогти цингу, - і тільки в 1795 році лимони і лайми стали стандартною добавкою в меню британських мореплавців. Жителі Давнього Єгипту страждали від так званої «курячої сліпоти» - вони боролися з нею, поїдаючи печінку (джерело вітаміну А).

З порушенням надходження вітамінів в організм пов'язані 3 принципових патологічних стани: відсутність вітаміну - авітаміноз, нестача вітаміну - гіповітаміноз, надлишок вітаміну - гіпервітаміноз.

Ймовірно, саме від єгипетських знахарів великий Гіппократ отримав ці знання, радячи своїм пацієнтам пару раз в тиждень харчуватися сирою печінкою в меду. У 1330 році в Пекіні китайський лікар Ху Сихуей опублікував тритомну працю «Важливі принципи їжі і напоїв», систематизував знання про терапевтичній ролі харчування і стверджував необхідність урізноманітнити раціон для підтримки здоров'я [2].

Наукові факти, що свідчать про існування групи речовин, необхідних для людського організму, накопичувалися вченими поступово. У своїй докторській дисертації 1880 року російський педіатр Микола Іванович Лунін стверджував, що для нормального функціонування живого організму крім білків, жирів, вуглеводів і води необхідні якісь додаткові речовини. Він писав: «Виявити ці речовини і вивчити їх значення в харчуванні було б дослідженням, які представляють великий інтерес». У 1906 році англієць Фредерік Хопкінс також припустив, що крім білків, жирів і вуглеводів їжа містить ще якісь речовини, необхідні для людського організму. Хопкінс назвав їх «accessory food factors».

Сам же термін «vitamine» був введений польсько-американським біохіміком Казімежем Функом в 1912 році - саме він виділив, нарешті, кристалічний препарат, невелика кількість якого виліковувала хвороба бері-бері (авітаміноз В1). Цьому передувало найважливіше спостереження голандського лікаря Християна Ейкмана. У 1889 році він виявив, що кури при харчуванні вареним білим рисом хворіють бері-бері, а при додаванні в їжу рисових висівок - виліковуються.

Християн Ейкман і Фредерік Хопкінс в 1929 році стали лауреатами Нобелівської премії з медицини - нагорода Хопкінса вручалася з формулюванням «За відкриття вітамінів, стимулюючих процеси росту», Ейкман отримав премію «За внесок у відкриття вітамінів». Роль Миколи Луніна і Казімежа Функа, таким чином, оцінені не була. У 1940-х роках було розшифровано хімічну будову вітамінів - і в фармакології почалася нова ера [3].

Короткий історичний нарис вивчення вітамінів наведений в таблиці 1.1.

Таблиця 1.1

Короткий історичний нарис вивчення вітамінів

Вчений	Рік	Відкриття
Д. Лінд	1747	Відкрита властивість цитрусвих попереджувати цингу
М.І. Лунін	1881	Установлено, що для життя організму потрібні вітаміни
Х. Ейкман	1897	Доведено, що хвороба бері-бері обумовлена нестачею вітамінів
К. Функ	1912	Запропоновано назву «вітаміни»
О. В. Палладій	1944	Синтезовано водорозчинний аналог вітаміну К - вікасол

1.1.2. Біологічне значення вітамінів

Вітамін В1 (тіамін). Тіамін перетворюється в організмі в кофермент кокарбоксілазу, який необхідний для правильного засвоєння вуглеводів і забезпечення тканин енергією, особливо нервової та м'язової. Тіамін покращує кровообіг, підвищує пізнавальну активність і розумову діяльність, необхідний для підтримки м'язового тонуусу внутрішніх органів. Володіючи антиоксидантними властивостями, захищає від порушень обміну речовин, пов'язаних з віком, вживанням алкоголю, палінням. При дефіциті цього вітаміну розвивається хвороба, відома як бері-бері (від сингалезького *beri* - слабкість). Основними проявами цієї хвороби є ураження периферичних нервів (звідси "перевалюється" хода), серцева недостатність, виснаження, фізична слабкість і набряки. Захворювання бері-бері частіше спостерігалось в країнах Південної та Східної Азії, де традиційно їли відшліфований рис, бідний тіамін і іншими вітамінами групи В. При його заміні на темний

необроблений рис захворювання зникало. Виявилося, що тіамін міститься головним чином в рисових висівках, а не в самому зерні.

Вітамін В2 (рибофлавін). Рибофлавін, як і тіамін, перетворюється в організмі в коферментную форму і бере участь в реакціях вуглеводного, білкового та жирового обміну. Він грає важливу роль в збереженні зору, підтримці нормального стану слизової оболонки травного тракту, в синтезі гемоглобіну, сприяє засвоєнню кисню тканинами шкіри, нігтів і волосся, покращує всмоктування заліза і вітаміну В6. Вітамін В2 бере участь в процесах перетворення енергії в клітинах. Дефіцит цього вітаміну призводить до розвитку ангулярного стоматиту (тріщини і кірочки в кутах рота, або так звані "заїди"), себорейного дерматиту (підвищення функції сальних залоз, особливо на обличчі), сухості і почервоніння язика, повертає до ослаблення зору. З'являються світлобоязнь, різь в очах, кон'юнктивіт (запалення зовнішньої оболонки ока і внутрішньої поверхні століття), головний біль, знижується апетит, зменшується маса тіла, розвивається слабкість. Як правило, недолік рибофлавіну в організмі пов'язаний із загальним гіповітамінозом і буває викликаний недоїданням.

Вітамін В6 (піридоксин). Піридоксин необхідний для нормального функціонування нервової системи, впливає на стан фізичного і психічного здоров'я. Він бере участь у більшості процесів, що відбуваються в організмі, активізуючи обмін амінокислот і гістаміну. Сприяє всмоктуванню вітаміну В12, впливає на імунітет і вироблення антитіл. Підвищує стійкість організму до розвитку атеросклерозу, корисний для профілактики утворення каменів в нирках. Виявляє слабку сечогінну дію. Піридоксин рекомендують в комплексній терапії алергії, артрити, бронхіальної астми. Дефіцит цього вітаміну проявляється недокрів'ям, судомами, головним болем, нудотою, лущенням шкіри, втратою апетиту, депресією, дратівливістю, погіршенням пам'яті, втратою волосся і багатьма іншими симптомами [4].

Вітамін Вс (Фолієва кислота). Фолієва кислота вперше була виявлена в листі шпинату. Ця кислота відноситься до вітамінів групи В і сама по собі не доступна, але в організмі перетворюється в активну коферментную форму. Вона необхідна для нормального утворення і ділення клітин. Разом з вітаміном В12 стимулює кровотворення. Бере участь в синтезі амінокислот та інших біологічно активних

речовин в організмі, в обміні холіну. Багато хто вважає фолієву кислоту "їжею" для мозку. Вона дуже важлива в період вагітності, тому що бере участь у формуванні нервової системи плода. Дефіцит фолієвої кислоти характеризується недокрів'ям, апатією, порушенням травлення, посивінням волосся, порушенням сну, задишкою, ослабленням пам'яті, слабкістю і так далі.

Вітамін В12 (Ціанокобаламін). Ціанокобаламін необхідний для запобігання недокрів'я і разом з фолієвою кислотою бере участь в процесах утворення клітин крові і покращує засвоєння заліза. Він потрібен для нормального травлення, всмоктування їжі, синтезу білків. Сприятливо діє на функції печінки. Запобігає пошкодження нервової тканини, захисної оболонки нервів. Бере участь в синтезі ацетилхоліну - посередника нервової системи, який залучений в процеси, пов'язані з пам'яттю і навчанням. Вітамін В12 частково синтезується мікробної флорою кишечника, інша частина надходить з їжею, головним чином, тваринного походження. Як правило, запаси його в організмі достатні. Так встановлено, що якщо ви вчора були м'ясоїдом, а сьогодні перейшли на вегетаріанську дієту і перестали вживати продукти, що містять вітамін В12, то вам буде потрібно майже 10 років, щоб використовувати весь накопичений в організмі вітамін. Нормальна потреба в цьому вітаміні всього 2 мкг на добу (в печінці дорослої людини зберігається приблизно 3000-5000 мкг) і дефіцит його виникає, перш за все, при порушенні механізму всмоктування в організмі, що найбільш характерно для літніх людей і пацієнтів із захворюваннями органів травлення. Дефіцит вітаміну В12, так само як і дефіцит фолієвої кислоти, призводить до розвитку недокрів'я, зниження утворення лейкоцитів і тромбоцитів, до порушень з боку шлунково-кишкового тракту. Він може з'явитися також причиною неврологічних порушень. Симптомами дефіциту вітаміну В12 можуть бути порушення ходи, хронічна втома, запор, депресія, збільшення печінки, галюцинації, захворювання очей та інші [5].

Вітамін РР (нікотинова кислота, нікотинамід, ніацин). Нікотинова кислота і її амід грають значну роль в життєдіяльності організму, беручи участь в утворенні ферментів, службовців переносниками водню і фосфору в біохімічних реакціях, і в процесах перетворення енергії в клітинах. Обидва ці речовини є специфічними

засобами лікування пелагри, завдяки чому і отримали свою назву - вітамін PP (pellagra preventive - попереджає пелагру). Пелагра є загальне захворювання, яке розвивається при тривалому голодуванні, неправильному харчуванні з переважанням в раціоні вуглеводів і виражених розладах травлення при захворюваннях шлунка і кишечника. Цікаво, що до відкриття кукурудзи Європа не знала, що таке пелагра. Кукурудзу в Європу завезли за часів Колумба, і скоро вона стала дуже популярним продуктом. Вона досить ситна, але міститься в ній нікотинова кислота погано засвоюється людиною. Корінні жителі Американського континенту готували кукурудзу з липовим соком, який допомагав засвоєнню нікотинової кислоти. Європейці спочатку не знали про це, тому у тих, хто харчувався в основному кукурудзою, розвивалася пелагра. Коли вирішили збагачувати продукти речовиною, що запобігає пелагру, виникла проблема. Справа в тому, що нікотинова кислота і нікотин звучать майже однаково, і люди стали думати, що в продукти будуть додавати тютюн. Тоді, щоб заспокоїти людей, нікотинової кислоти було придумано назву ніацин.

Пелагра починається з появи стомлюваності, слабкості, апатії, знижується апетит, підвищується дратівливість. У міру її розвитку виникає пронос, мова стає запаленим і червоним, з'являються гастрит, шкірні висипання (почервоніння), що посилюються під дією сонця, у багатьох виникають порушення центральної нервової системи (погіршення настрою, депресія і навіть психози).

Крім протипелагричних властивостей, нікотинова кислота і нікотинамід покращують вуглеводний і ліпідний обмін, діючи позитивно при легких формах діабету, захворюваннях печінки, серця, виразковій хворобі шлунка і дванадцятипалої кишки, ентероколітах, мляво гояться ранах і виразках [6].

до комплексу вітамінів групи В відноситься також ряд важливих біологічно активних речовин, дефіциту яких у людини практично не спостерігається. Це біотин (вітамін Н), пантотенова кислота (вітамін В5), пангамовая кислота (вітамін В15), карнітин (вітамін росту або вітамін ВТ), холін (вітамін В4), параамінобензойна кислота (вітамін ВХ) і деякі інші.

Біотин сприяє росту клітин, бере участь в синтезі жирних кислот, у процесах засвоєння інших вітамінів групи В. Він необхідний, в першу чергу, для підтримки

здорового стану шкіри і волосся, нормального функціонування потових залоз, нервової тканини і кісткового мозку. Недолік біотину зустрічається рідко, так як біотин синтезується в достатній кількості кишкової мікрофлорою. Дефіцит біотину можливий при хворобливу пристрасть до яєчних білків, так як сирі яйця містять білок, що зв'язує біотин в кишечнику. Відомий випадок, коли один фанат яєчних білків з'їдав від 2 до 10 сирих яєць в день, і незабаром у нього стала лущитися шкіра, з'явилася депресія, нудота, він втратив апетит. Видужав він лише тоді, коли відмовився від своєї пристрасті до яєчних білків.

Пантотенова кислота в достатній кількості міститься в харчових продуктах і частково синтезується мікробної флорою кишечника. Вона бере участь в обміні жирів і вуглеводів, синтезі ацетилхоліну - одного з основних посередників нервової системи людини, стимулює утворення важливих для нас гормонів - кортикостероїдів.

Холін є речовиною, з якого в організмі утворюється ацетилхолін. Він входить до складу лецитину та інших структурних елементів всіх клітин організму, бере участь в обміні жирів і холестерину. Перешкоджає накопиченню жирів в печінці.

Вітамін С (аскорбінова кислота)

Аскорбінова кислота є найважливішим антиоксидантом нашого організму, пов'язуючи вільні радикали, які утворюються при окислювально-відновних реакціях. Вона необхідна для нормального росту тканин і протікання відновних процесів в них, зміцнення захисних сил організму. Бере участь в регулюванні вуглеводного обміну, згортання крові, утворенні стероїдних гормонів, в обміні фолієвої кислоти та ряду найважливіших амінокислот; підвищує всмоктування заліза. Однією з важливих функцій аскорбінової кислоти є участь в синтезі колагену - основного білка сполучної тканини, а також в нормалізації проникності капілярів. Дія аскорбінової кислоти як антиоксиданту посилюється при спільному застосуванні з вітаміном Е, який вловлює вільні радикали в клітинних мембранах. Важкий дефіцит цього вітаміну призводить до розвитку цинги (скорбут - звідси назва цього вітаміну "аскорбінова", тобто знімає скорбут) - захворювання, при якому відбувається загальний розпад колагенових сполучних тканин. Цинга характеризується розм'якшенням і кровотечею ясен, набряками, загальною слабкістю, крапковими крововиливами під шкірою, анемією.

На щастя, в даний час це захворювання рідко зустрічається в розвинених країнах. У минулому ж цинга була справжнім бичем людства, особливо у моряків і народів північних країн, які споживали мало свіжих овочів і фруктів.

Функціонально з аскорбіною кислотою тісно пов'язані так звані біофлавоноїди - група вітаміноподібних речовин, часто позначаються як вітамін Р. Ці речовини в комплексі з вітаміном С зменшують проникність і ламкість капілярів. Крім того, вітамін Р оберігає аскорбінову кислоту від окислення. Основними представниками групи вітаміну Р є рутин і кверцетин [6].

Вітамін А (ретинол). Вітамін А бере участь в утворенні зорових пігментів, що регулюють адаптацію ока до темряви. Тому одним з перших ознак дефіциту цього вітаміну є нічна ("куряча") сліпота (гемералопія). Вітамін А забезпечує нормальний ріст у дітей, нормалізує обмінні процеси в шкірі і слизових оболонках різних органів. Підвищує імунітет, сприяє загоєнню виразок, бере участь у формуванні кісток і зубів, сприяє депонуванню жирів. Діє як антиоксидант, уповільнює процеси старіння, бере участь в засвоєнні білка. Природним попередником вітаміну А є бета-каротин, що міститься в багатьох рослинних харчових продуктах. Бета-каротин - оранжево-жовтий пігмент, якому зобов'язана своїм кольором морква. А він "взяв" її назва, так як латинське *carota* означає морква. В організмі людини бета-каротин перетворюється на вітамін А. Великі дози вітаміну А, що приймаються протягом тривалого часу, викликають токсичні ефекти. Це обумовлено здатністю вітаміну А накопичуватися в печінці. Ознаками передозування є сонливість, загальне нездужання, хвороблива припухлість навколо кісток, порушення ходи, нудота, блювота, шкірні висипання, збільшення розмірів печінки та інші.

Відомо, що ескімоси ніколи не їдять печінку білого ведмедя, вважаючи її отруйною. А причина цього в підвищеному вмісті вітаміну А, який в 100 разів перевищує найвищу лікувальну дозу. Не дивно, що добре пообідати цієї печінкою людина скоро починає відчувати себе млявим, потім у нього з'являються головний біль і блювота, починає лущитися шкіра. Інший приклад - з морквяним соком, який, як відомо, містить каротин. Однією пацієнтці доктор порадив регулярно пити морквяний сік. Перестаравшись, вона стала пити до 1,5 л цього соку в день. Через

якийсь час настав важке ураження печінки і підшлункової залози, яке привело в кінцевому підсумку до смерті. На щастя, більшість вітамінів при передозуванні не так токсичні і не володіють такою здатністю накопичуватися в організмі [7].

Вітамін D (ергокальциферол, холекальциферол, дігидротахістерол, альфакальцідол, кальцитріол). Вітаміном D називають два близьких за будовою і дією речовини - ергокальциферол (вітамін D₂) і холекальциферол (холекальциферол або вітамін D₃). Вітамін D частково утворюється в шкірі під дією сонячного світла, однак переважна більшість надходить в організм з їжею. Біологічна роль вітаміну D полягає в регулюванні обміну кальцію і фосфору в організмі. Разом з ним метаболізм кальцію і фосфору контролюють паратгормон і кальцитонін, про які ми згадували в розділі, присвяченому гормонів. Вітамін D сприяє всмоктуванню цих мінералів з кишечника, накопичення в кістках і перешкоджає вимиванню їх з кісток. Причому в організмі діють не ергокальциферол і холекальциферол, а активний продукт їх перетворення - кальцитріол. Активація надходять з їжею форм вітаміну D відбувається в два етапи: спочатку в печінці, а потім в нирках. При захворюваннях нирок другий етап порушений, і застосування ергокальциферолу і холекальциферолу стає неефективним.

Остеомаліяцією можуть страждати жінки, що виснажують себе незбалансованими дієтами, а також багато народжували жінки, так як зростаючий плід і дитина, яка отримує грудне молоко, споживають вітамін D і кальцій з організму матері. Проте в переважній більшості випадків остеомаліяція не є наслідком авітамінозу D (може бути, за винятком голодуючого населення), а розвивається через порушення обміну речовин, зокрема, при нирковій недостатності. Остеомаліяція може розвинутиися і у хворих, які страждають на епілепсію, що пов'язують з підвищенням у них активності ферментів, що беруть участь у метаболізмі вітаміну D.

Препарати вітаміну D широко застосовують для профілактики і лікування остеопорозу, при якому відбувається витончення і розсмоктування структурних елементів кістки, і інших захворювань, пов'язаних з порушенням кальцієвого обміну, а також при деяких захворюваннях щитовидної залози.

Вітамін Е (альфа-токоферол). Вітамін Е є природним антиоксидантом, який захищає клітини організму від дії вільних радикалів. Вільні радикали утворюються в нормі в процесі обміну речовин і, якщо їх не інактивувати, можуть взаємодіяти з ліпідами клітинних мембран, руйнуючи їх і завдаючи шкоди клітинам. Тому така велика роль вітаміну Е, що поглинає вільні радикали, в життєдіяльності організму.

Скептики часто говорять, що вітаміну Е ніяк не можуть знайти хвороба, яку він міг би лікувати. І це частково правда, так як цей вітамін бере участь в різноманітних процесах, що відбуваються в нашому організмі. Він покращує кровообіг, необхідний для протікання відновних процесів в тканинах, сприяє зниженню артеріального тиску, грає роль в запобіганні розвитку катаракти, важливий для нормального функціонування нервової системи, підтримує здоровий стан волосся і шкіри, уповільнює процеси старіння, сприяє засвоєнню і захищає від руйнування інші жиророзчинні вітаміни. І цей перелік можна продовжувати.

Як правило, кількість вітаміну Е, що надходить в наш організм з їжею, досить, щоб запобігти його дефіцит, однак, до нього може призвести надмірне вживання технологічно обробленої їжі в вигляді блюд швидкого приготування і кулінарних напівпродуктів. Тому з метою профілактики призначають препарати вітаміну Е або полівітамінні препарати, що містять достатню кількість вітаміну Е.

Вітамін К (філлохинон, менахінон, фитоменадион, менадіона натрію бісульфіт)

Вітамін К (перша буква німецького слова - коагуляція, або згортання) називають протівогеморагічеській, або коагуляційний вітаміном, так як він бере участь у синтезі протромбіну та інших факторів, які допомагають крові згортатися.

Вперше вітамін К був відкритий в експериментах по вигодовуванню курчат. Ми згадували про це в розділі 3.6, присвяченій засобів, що впливає на кров і процеси кровотворення. У людини вітамін К синтезується в організмі бактеріями кишечника або надходить з їжею. Як правило, надходить з їжею вітаміну К буває досить, щоб не розвивалася кровоточивість, але при певних станах в організмі може виникнути дефіцит цієї речовини. Вітамін К існує в двох природних формах - вітамін К1 (філлохинон) і вітамін К2 (менахінон), що представляють собою жиророзчинні речовини, для всмоктування яких необхідні прийом жирів і секреція жовчі.

Утилізація вітаміну К відбувається в печінці, тому печінкова недостатність може призвести до зниження рівня протромбіну. Дефіцит вітаміну К може також виникнути при зміні мікрофлори в кишечнику, у новонароджених, при тривалому лікуванні антибіотиками, при жовтяниці і інших захворюваннях, що знижують надходження жовчі в кишечник, при порушенні процесів всмоктування в тонкій кишці.

Для лікування цих станів, а також при загрозі розвитку кровотеч внаслідок застосування непрямих антикоагулянтів використовують синтетичний аналог вітаміну К1 - фитоменадион і водорозчинний менадіона натрію бісульфіт (К3), який в печінці перетворюється на вітамін К1.

Крім вітамінів, до живого організму життєво необхідні мінеральні речовини і мікроелементи. Вони входять до складу клітини, беруть участь в регулюванні її життєдіяльності, необхідні для формування клітин крові, кісток і інших тканин, для нормального функціонування нервової, ендокринної, серцево-судинної та інших систем організму. Включаючись до складу ферментів, вони беруть участь в численних процесах перетворення енергії і речовин, росту і відновлення клітин і тканин.

1.1.3. Класифікація вітамінів

У міру відкриття окремих вітамінів їх позначали буквами латинського алфавіту (напр. А, В, С та ін.). З виділенням нових в індивідуальному стані стали помічати подібність їх будови та відмінність біологічної дії, тому до літер почали додавати цифрові індекси (В₁, В₂, К₁ та ін.). Після того, як для них визначили хімічну структуру, їх назви стали набувати хімічного сенсу і на сьогодні для позначення вітамінів використовують хімічні позначення і рідше — буквені [7]. Порівняння жиророзчинних і водорозчинних вітамінів наведена в таблиці 1.2.

Сучасна класифікація вітамінів не є завершеною. Вона включає фізико-хімічні властивості (зокрема, розчинність), хімічну природу і літературні позначення. Залежно від розчинності розрізняють жиророзчинні й водорозчинні вітаміни [10].

У наведеній нижче класифікації вітамінів, крім буквенного найменування, у дужках дається позначення основного біологічного ефекту, іноді із приставкою «анти», що вказує на здатність даного вітаміну запобігати або усувати розвиток відповідного захворювання [7].

I. Жиророзчинні вітаміни:

1. Вітамін А (антиксерофтальмічний);
2. Вітамін Д (антирахітичний);
3. Вітамін Е (вітамін розмноження);
4. Вітамін К (антигеморрагічний);

II. Водорозчинні вітаміни:

1. Вітамін В₁ (антиневричний);
2. Вітамін В₂ (рибофлавін);
3. Вітамін В₃ (пантотенова кислота, антидерматитний)
4. Вітамін В₅ (Вітамін РР, антиалергічний, ніацин);
5. Вітамін В₆ (антидрматитний, адермін);
6. Вітамін В₁₂ (антианемічний);
7. Вітамін В_с(антианемічний, фолієва кислота, фолацин);
8. Біотин (вітамін Н, антисеборійний);
9. Вітамін З (антискорбутний);
10. Вітамін Р (вітамін проникності).

Згідно з хімічною класифікацією всі вітаміни ділять на такі групи: аліфатичного ряду (кислота аскорбінова, пантотенова, пангамова, метилметіонінсульфонію хлорид); аліциклічного ряду (ретиноли, кальцифероли); ароматичного ряду (похідні нафтохінону); гетероциклічного ряду (токофероли, біофлавоноїди, нікотинова кислота та її амід, піридоксини, тіамін, кислота фолієва, рибофлавін, кобаламіни). Вітаміни отримують шляхом хімічного (А, С, В₆, В₁) та мікробіологічного (рибофлавін, В₁₂) синтезу або виділяють із природних джерел [8].

Згідно з хімічною класифікацією всі вітаміни ділять на такі групи: аліфатичного ряду (кислота аскорбінова, пантотенова, пангамова, метилметіонінсульфонію хлорид); аліциклічного ряду (ретиноли, кальцифероли); ароматичного ряду (похідні

нафтохінону); гетероциклічного ряду (токофероли, біофлавоноїди, нікотинова кислота та її амід, піридоксини, тіамін, кислота фолієва, рибофлавін, кобаламіни). Вітаміни отримують шляхом хімічного (А, С, В₆, В₁) та мікробіологічного (рибофлавін, В₁₂) синтезу або виділяють із природних джерел.

Таблиця 1.2

Порівняння жиророзчинних і водорозчинних вітамінів

Показники	Водорозчинні вітаміни	Жиророзчинні вітаміни
Всмоктування	Безпосередньо в кров	Спершу в лімфу, потім в кров
Транспорт	У вільній формі	Багато потребують транспортних білків
Зберігання	Вільно циркулюють у заповнених водою частинах тіла	Запасуються у жировій тканині
Екскреція	Надлишок швидко виводиться нирками	Виведення надлишку важче, накопичуються у жировій тканині
Токсичність	Для деяких вітамінів можливо досягти токсичних концентрацій, вживаючи у формі харчових додатків	Більш ймовірно досягти токсичних концентрацій, вживаючи у формі харчових додатків
Потреби	Необхідне регулярне вживання (не рідше 1—3 діб)	Вживання може бути рідшим (раз на тиждень, або навіть місяць)

Крім цих двох головних груп вітамінів, розрізняють групу різноманітних хімічних речовин, що частково синтезуються в організмі і мають схожі вітамінні властивості. Для людей і тварин ці речовин прийнято поєднувати в групу вітаміноподібних. До них відносять: холін, ліпоеву кислоту, вітамін В₁₅(пангамова

кислота), оротову кислоту, інозит, убіхінон, параамінобензойну кислоту, есенціадні поліненасичені жирні кислоти, вітамін U (протівирозковий фактор) і ряд інших [8].

1.1.4. Номенклатура вітамінів

- Тривіальна номенклатура враховує історичні назви вітамінів. Вітаміни позначаються літерами латинського алфавіту (А, В, С, D, Е та ін). Вітаміни групи В також мають нижній цифровий індекс (B_n , де $n = 1 \dots 12$). Окремі вітаміни являють собою групу близьких за хімічною структурою сполук – вітамерів. Вітамери позначаються однією і тією ж літерою латинського алфавіту з різними цифровими індексами: вітамери A_1, A_2, D_1, D_2, D_3 та ін [8].

- Хімічна або структурна. В даній номенклатурі відображається хімічна будова вітамінів. Наприклад, нікотинамід, кобаламін та інші.

- Медична. Назва складається з приставки “анти” та відповідного захворювання, яке попереджується даним вітаміном. Наприклад, вітамін С – антискорбутний [9].

1.2. Характеристика вітаміну В12

1.2.1. Історія відкриття вітаміну В12

На підставі ряду робіт було встановлено, що в печінці тварин міститься речовина, що регулює кровотворення і що володіє лікувальним дією при злоякісній (пернициозной) анемії у людей і тварин. Вже однократна ін'єкція декількох мільйонних часток грама цієї речовини викликає поліпшення кровотворної функції. Це речовина отримала назву вітаміну В12, або антианемического вітаміну.

Історія відкриття вітаміну В12 почалася в середині ХІХ століття з опису захворювання, основним проявом якого була особлива форма анемії зі смертельними наслідками. Через 20 років це захворювання назвали "пернициозная анемія" - тобто "злоякісне недокрів'я". Вивченням цього захворювання займався вчений Майнот

Касл. Думаючи про те, чому в кістковому мозку у хворих на злоякісні недокрів'ям не дозрівають нормальні еритроцити, і пам'ятаючи про зниженій кислотності шлункового соку у них, Касл припустив, що в печінці у здорових людей виробляється якийсь фактор, що сприяє кровотворенню. Цей фактор утворюється, ймовірно, з міститься в печінці речовини, подібного вітаміну В2, і іншого з'єднання, що надходить в нормі з шлунково-кишкового тракту.

Перевірити цю думку Касл вирішив на собі, бо знав, що печінка і шлунок у нього здорові. Протягом декількох тижнів він щодня з'їдав біфштекс і через деякий час зондом витягував свій шлунковий сік разом з напівперевареним біфштексом. Призначення цієї маси хворому зі злоякісним недокрів'ям дало позитивні результати. Він став швидко одужувати. Склад крові його наближався до норми.

Призначення хворому одного біфштекса або одного шлункового соку здорового людини не зміцив його. Касл припустив, що шлунок здорової людини виділяє якусь речовину (внутрішній фактор), яке, з'єднуючись з невідомою речовиною біфштекса-м'яса (зовнішнім фактором), утворює той самий з'єднання, яке здатне накопичуватися в печінці і, вступаючи потім в кістковий мозок, надавати позитивний вплив на кровотворення [9].

Думка Касла виявилася правильною. Однак треба було ще більше 20 років наполегливої праці багатьох вчених для її докази і підтвердження. Речовиною, що містяться в м'ясі - «зовнішнім фактором», виявився виділений в 1948 р вітамін В12. Встановлено була хімічна структура його: він містить кобальт і ціан. Внутрішній фактор, що виділяється стінкою шлунка, виявив польський вчений Гласс лише в 1952 р Ним виявився складний білок - гастромукопротеин.

Пізніше встановлено, що гастромукопротеин оберігає найцінніше для кровотворення вітамін В12 від руйнування його мікробами кишечника і сприяє проходженню через кишковий бар'єр в печінку, звідки він надходить в кров.

Надалі вченим вдалося виділити вітамін В12 в чистому вигляді для широкого використання в клініці, що дало можливість вважати переможеною цю страшну хворобу і допомогло впливати на кровотворення при ряді інших форм недокрів'я.

1.2.2. Хімічна структура вітаміну В12

Вітамінами В₁₂ називають групу кобальтвмісних біологічно активних речовин, які називаються кобаламінами (рис.1.1). Визнана формула вітаміну В12 - С₆₃Н₈₈О₁₄Н₁₄РСо. До них відносять власне ціанокобаламін - продукт, одержаний при хімічному очищенню вітаміну ціанідами, гідроксикобаламін та дві коферментні форми вітаміну В₁₂: метилкобаламін і 5-дезоксиаденозилкобаламін [9].

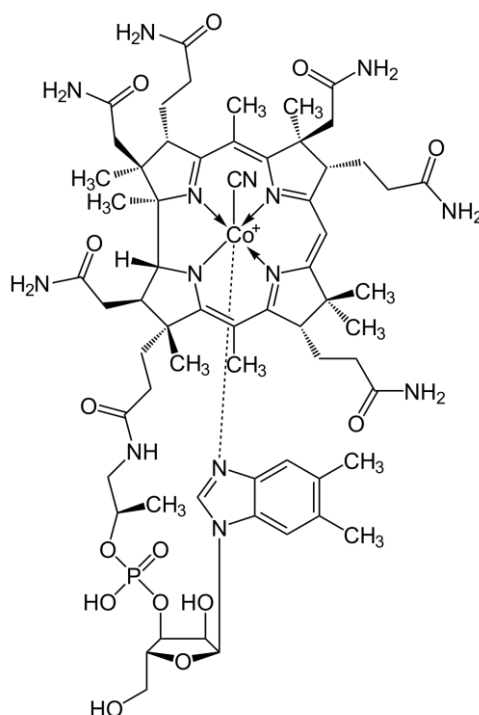


Рис.1.1. Структурна формула кобаламіну

В12 має найскладнішу в порівнянні з іншими вітамінами структуру. що складається з тетрапіролового кільця з атомом кобальту у центрі. Чотири координаційних зв'язку кобальт утворює з атомами азоту. Останій, шостий координаційний зв'язок кобальту залишається вільним: саме по цьому зв'язку і приєднуються ціаногрупи, гідроксильна група, метильний або 5'-дезоксиаденозильний залишок з утворенням чотирьох варіантів вітаміну В₁₂, відповідно.

Молекулу можна поділити на дві основні частини, відомі як "планарна група" і "нуклеотид"; друга частина лежить в площині, майже перпендикулярній до площини першої частини, яка має дуже великий, хоча і неповний, схожістю з порфіринами. Центральний атом кобальту з'єднаний з чотирма відновленими піррольними кільцями, що утворюють макрокільця. Три з чотирьох з'єднань між кільцями утворені мезоуглеродним атомом (вуглецевим містком), характерним для порфіринів. Однак в четвертому місці з'єднання існує прямий зв'язок між двома α -вуглецевими атомами кілець D і A. макрокільця містить 6 сполучених подвійних зв'язків, що утворюють єдину пов'язану систему.

Ковалентний зв'язок вуглець-кобальт в структурі ціанокобаламіну (рис. 1.2) - єдиний в живій природі приклад ковалентного зв'язку метал-вуглець.

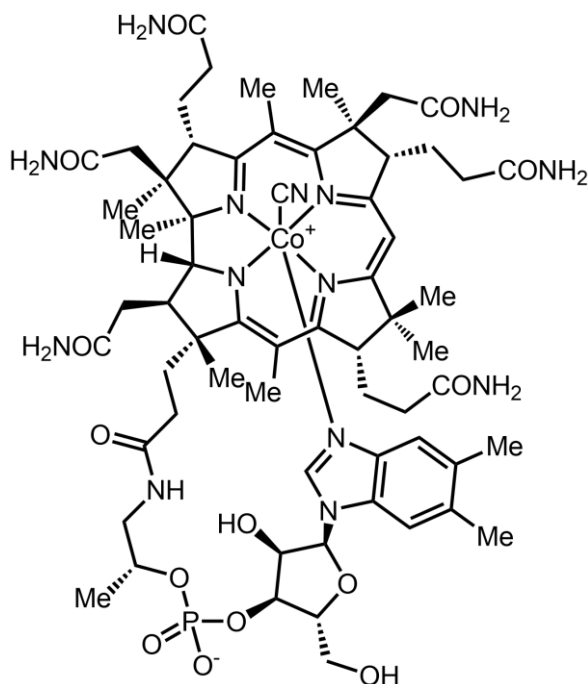


Рис. 1.2. Структурна формула ціанокобаламіна

Коферментні функції: 1) метилкобаламін бере участь в реакціях трансметилування в складі ферментів метилтрансфераз [10].

Прикладами даних реакцій є: перетворення дезокси-УМФ в дезокси-ТМФ; • синтез метіоніну з гомоцистеїну (рис. 1.3).

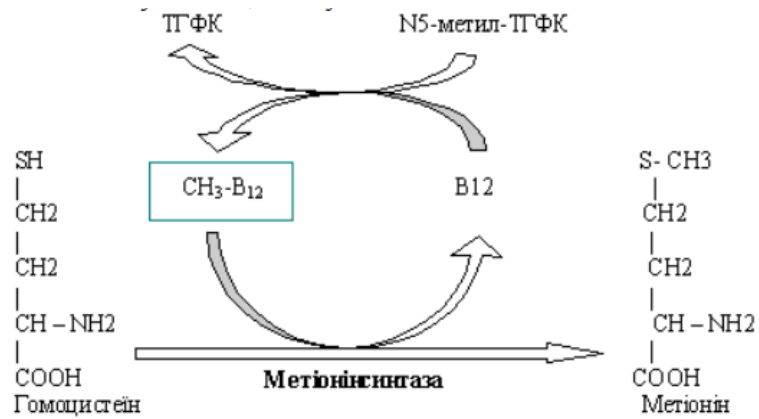


Рис. 1.3. Реакція синтезу метіоніну з гомоцистеїну

Утворений метіонін слугує донором метильних груп для синтезу креатину, адреналіну, ацетилхоліну, карнітину та ін.

Дезоксиаденозилкобаламін є коферментом метилмалоніл-КоА-мутази, яка перетворює метилмалоніл-КоА в сукциніл-КоА (рис 1.4). Ця реакція відбувається при окисленні жирних кислот з непарним числом атомів вуглецю, бокового ланцюга холестерину і вуглецевих радикалів деяких амінокислот [10].

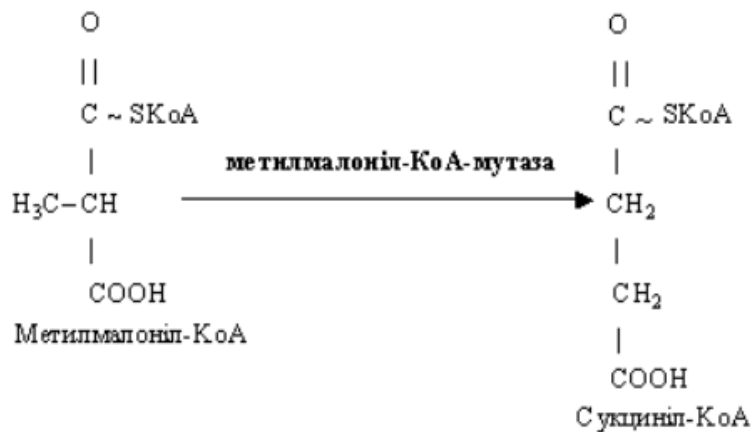


Рис. 1.4. Реакція перетворення метилмалоніл-КоА в сукциніл-КоА

У 13 з 19 вуглецевих атомів, складових макрокілля, водень повністю заміщений метильних груп або довгими бічними ланцюгами - або ацетамідними, або пропіонамідними радикалами

На відміну від нуклеотидів нуклеїнових кислот так званий нуклеотид вітаміну В₁₂ не містить пурину або піримідину. Замість них підставою служить 5,6-діметилбензіміназол. Цукор представлений рибозою, але з α -глікозидної зв'язком, знову-таки на відміну від β -зв'язку в нуклеїнових кислотах. Рибоза фосфорильована при 3-му атомі вуглецю. Фосфат утворює ефірну групу з 1-аміно-2-пропиловим спиртом, який, крім того, з'єднаний амідній зв'язком з ланцюгом пропіонової кислоти при кільці D.

1.2.3. Значення вітаміну В₁₂

При взаємодії вітаміну В₁₂ з молекулами фолієвої кислоти виробляється достатня кількість холіну для забезпечення стійкості організму до повсякденних стресів. Вітамін В₁₂ разом з вітаміном А бере участь в синтезі тканин тіла, забезпечуючи вступ каротиноїдів (провітаміни А) в обмін речовин і перетворення їх в активний вітамін А. Добова норма вітаміну В₁₂ для дорослих – від 2 до 7 мкг, для дітей – від 0,3 до 1 мкг, загальний вміст в організмі людини – 2-5 мг, більша частина акумулюється в печінці [11].

Вітамін В₁₂ бере участь в найважливіших біохімічних процесах мієлінізації нервових волокон, встановлено достовірний зв'язок наявності депресивного стану у людини з вмістом вітаміну В₁₂.

Ціанокобаламін має виражену ліпотропну дію, він попереджає жирову інфільтрацію печінки, підвищує споживання кисню клітинами при гострій і хронічній гіпоксії. Вітамін В₁₂ бере участь в процесах трансметилування, перенесення водню. Ціанокобаламін бере безпосередню участь в процесі синтезу метіоніну. Також він відіграє важливу роль в регуляції функції кровотворних органів: бере участь в синтезі пуринових і піримідинових основ, нуклеїнових кислот, необхідних для процесу еритропоезу, активно впливає на накопичення в еритроцитах сполук, що містять сульфгідрильні групи.

Ціанокобаламін допомагає нормалізувати знижений кров'яний тиск. Стимулюючи синтез протеїну в людському організмі, є своєрідним анаболіком.

Останні дослідження показали, що вітамін В₁₂ має важливе значення і для кісткоутворення. Зростання кісток може відбуватися лише в тому випадку, коли в остеобластів (клітинах, з яких створюються кістки) є достатній запас вітаміну. Вітамін збільшує кількість лейкоцитів і прискорює їх діяльність, , завдяки даному препарату підвищується опірність організму до всіх можливих захворювань. Нестача вітаміну В₁₂ значно скорочує життя хворих на СНІД. Вітамін В₁₂ стимулює діяльність кровоносних органів і робить істотний вплив на здатність людини до сприйняття і засвоєння нової інформації. Його недолік викликає депресивний стан і розосередження уваги. Ціанокобаламін є одним з речовин, необхідних для здоров'я репродуктивних органів. Дуже важливий для підтримки в хорошій формі жіночого і чоловічого здоров'я.

1.2.4. Джерела надходження до організму вітаміну В₁₂

Рослини не синтезують вітамін В₁₂. Тільки мікроорганізми травного тракту ссавців і птахів здійснюють цей синтез. Тому стічні води, гній, мул, підстилка, ґрунт, містять вітамін В₁₂.

Щоб використовувати вітамін В₁₂, його потрібно спочатку «відірвати» від білка під впливом НСІ шлунку або трипсину в кишечнику, а потім він зв'язується з «внутрішнім чинником» (мукопротеїном) шлункового соку і у вигляді цього комплексу всмоктується в кровоносну систему. Вітамін В₁₂ депонується в печінці в кількості, достатній на період до декількох років, тому реального дефіциту вітаміну В₁₂ в організмі тварини практично немає.

Даний вітамін можна отримати так само з тваринних продуктів.

Найбільше його в яловичої і телячої печінки, нирках, яєчних жовтках, сухому молоці (нежирному), сардини, лососеві, оселедцеві, устрицях, крабах. Дещо менше вітаміну В₁₂ в м'ясі - яловичині, свинині, курці, морепродуктах, кисломолочних продуктах і твердому сири [11].

У невеликих кількостях ціанокобаламін є в рідкому молоці і м'якому домашньому сири. Вміст вітаміну В₁₂ в сухому знежиреному молоці становить 40-50

мг / кг, в цілісному молоці корів - 4-4,5, рибного борошна - 100-200, вмісті рубця - 80-250 мг / кг.

1.2.5. Хвороби викликані дефіцитом вітаміну В12

Брак вітаміну В12 призводить, перш за все, до розвитку нервових захворювань, в тому числі і важких. Так, дефіцит ціанокобаламіну може стати причиною важкого захворювання - розсіяного склерозу, при якому мієлінові шари, що захищають нервові клітини, поступово руйнуються. Результатом цього процесу є паралічі, а термін життя різко скорочується. У жуйних тварин в рубці активний синтез вітаміну В12 при наявності мікроелемента кобальту, при авітамінозі В12 у них відзначають виражену затримку росту, виснаження, знижений апетит, дегенеративні зміни в печінці. Вітамін В12 необхідний для виводимості, зростання курчат і при попередженні ерозії шлунка. Встановлено передача вітаміну від курей-несучок курчатам. Смертність може бути високою серед курчат з недоліком вітаміну в період їх виведення. Ембріони з недоліком вітаміну В12 мають множинні крововиливи.

Нормальний білковий, жировий і вуглеводний обмін неможливий без вітаміну В12, так як без нього не можуть працювати інші активні речовини. Тільки при взаємодії ціанокобаламіна з іншими речовинами можливий такий процес, як синтез в ядрах клітин РНК і ДНК, що містять всю спадкову інформацію.

Вітаміну В12 потрібно так мало, але його нестача, а тим більше дефіцит, можуть обернутися катастрофою. Біохіміки називають його дивовижною загадкою природи, і визнають, що створити щось подібне штучним шляхом було б неможливо, навіть якщо б всі вчені планети працювали над цим, використовуючи всі новітні технології - настільки складною виявилася молекула ціанокобаламіна [12].

Нестача вітаміну В12 також викликає захворювання шлунково-кишкового тракту, тому що їжа погано засвоюється; болу в голові і запаморочення, сонливість і дратівливість; розлади пам'яті і зору, аж до галюцинацій; імунодефіцити. У випадку з цим вітаміном все складніше, ніж з більшістю інших: навіть незначне зниження норми вітаміну В12 може серйозно пошкоджувати нервову систему і мозок.

Надлишок вітаміну В12 можливий тільки при дачі синтетичного цианкобаламіна, або при його введенні у вигляді ін'єкцій. Може виникнути набряк легенів, тромбоз, серцева недостатність або кропив'янка. Оскільки вітамін В12 водорозчинний, ці наслідки неважко прибрати, однак краще не допускати передозування.

1.3. Висновки до розділу

Отже, організму людини необхідні принаймні 13 різних вітамінів, добові потреби яких коливаються від 0,01 до 100 мг. Нестача чи відсутність вітамінів у їжі викликає глибокі порушення в організмі, що призводить до тяжких захворювань. Залежно від розчинності розрізняють жиророзчинні й водорозчинні вітаміни. Жиророзчинні вітаміни впливають на обмінні процеси шляхом посилення синтезу багатьох важливих біополімерів, беруть участь у процесах згортання крові, фоторецепції. Водорозчинні вітаміни входять до складу ферментів переважно у вигляді кофакторів і забезпечують нормальне функціонування вибіркових органів і систем організму, регулюють обмін речовин, функціональний стан центральної нервової системи, живлення тканин, стійкість і проникність кровоносних судин.

Вітамін В12 впливає на кровотворення, активує процеси згортання крові, бере участь в синтезі амінокислот, нуклеїнових кислот, активує процеси обміну вуглеводів та жирів. Впливає на функції печінки, нервової і травної систем.

При недостатньому споживанні вітаміну В12 виникає анемія, порушуються функції нервової системи, з'являється слабкість, запаморочення, задишка, знижується апетит.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкти досліджень

2.1.1. Характеристика біологічного агента *Propionibacterium shermanii*

Деякі спеціальні штами пропіоновокислих бактерій і актиноміцетів є продуцентами тільки вітаміну В₁₂ і не синтезують антибіотики. У промисловості переважно використовують пропіоновокислі бактерії. Однією з істотних позитивних сторін процесу є відсутність аерації. Відомої трудностю є підвищені вимоги в дотриманні асептичних умов процесу. При біосинтезі антибіотиків, особливо широкого спектра, що утворюється в середовищі антибіотик має бактеріостатичну або бактерицидну дію на сторонню мікрофлору. При біосинтезі вітаміну В₁₂ небезпека зараження значно вище [13].

У природі вітамін В₁₂ і споріднені кориноїдні сполуки знаходять у клітинах мікроорганізмів, в тканинах тварин і деяких вищих рослинах (горох, лотос, пагони бамбука, листя і стручки квасолі). Проте походження вітаміну В₁₂ у вищих рослинах остаточно не встановлено. Такі нижчі еукаріоти, як дріжджі і міцеліальні гриби, кориноїди не утворюють. Організм тварин не здатний до самостійного синтезу вітаміну. В сімействі *Propionibacteriaceae* є і інші представники, здатні до високого накопичення вітаміну В₁₂ в клітинах. Це перш за все *Eubacterium limosum* [13].

Як продуценти вітаміну практичний інтерес мають багато представників актиноміцетів і споріднених мікроорганізмів. Істинний вітамін В₁₂ в значних кількостях синтезує *Nocardia rugosa*. Активні продуценти вітаміну виявлені серед представників роду *Micromonospora*: *M. purpureae*, *M. echinospora*, *M. halofitica*, *M. fusca*, *M. halceae*. Високою кобаламінсинтезуючою активністю володіють метаногенні бактерії, наприклад, *Methanosarcina barceri*, *M. vacuolata* і окремі штами галофільного виду *Methanococcus halophilus*. Останній організм синтезує більше 16

мг кориноїдів на грам біомаси. Настільки високого вмісту кориноїдів не визначено в жодного іншого з вивчених мікроорганізмів. Причина високого вмісту кориноїдів у метаногенних бактерій не встановлена. Кориноїди синтезують суворо анаеробні бактерії з роду клостридій.

У *Clostridium tetanomorphum* та *Clostridium sticrlandii* аденозилкобаламін входить до складу ферментних систем, які каталізують специфічні реакції ізомеризації таких амінокислот, як глютамінова кислота, лізин, орнітин. В значних кількостях утворюють вітамін В12 ацетогенні клостридії *C. thermoaceticum*, *C. Formicoaceticum*, які синтезують ацетат із CO₂. Зацікавленість представляють термофільні бацили, а саме *Bacillus circulans* і *Bacillus Stearothermophilus*, які ростуть відповідно при 60 та 75°C та за 18 годин культивування без дотримання стерильних умов дають високий (2,0-6,0 мг/л.) вихід вітаміну. Кориноїди синтезують *Rhodopseudomonas palustris*, фототрофні пурпурні бактерії *Rhodobacter sphericus*, *Rhodobacter capsulatus* та ряд інших видів. В таблиці 2.1 наведені мікроорганізми, які в силу високого рівня кобаламінів в різний час розглядались як його потенціальні продуценти в промисловості [13].

Таблиця 2.1

Утворення вітаміну В12 різними штамми

Штам	Джерело вуглецю	Вихід, мг/л
<i>Micromonospora sp.</i> <i>Nocardia rugolaa</i>	глюкоза	11,5
<i>Propionibacierium freudenreichii</i>	тросникова меляса	14
<i>Propionibaderium Khermanii</i>	глюкоза	25
<i>Propionibacterium vannielii</i>	глюкоза	23-40
<i>Methanobacillus omelianskii</i>	глюкоза	35
<i>Protaminobacter ruber</i>	лактоза	2,6
<i>Corynebacterium</i>	метанол	8,8
<i>Rhodopseudomon</i>	парафіни	2,5
<i>Propionibacterium shermanii</i>	глюкоза	58

Активно продукують вітамін В12 представники роду *Propionibacterium*. Природні штами пропіоновокислих бактерій утворюють 1,0 – 8,5 мг/л кориноїдів, але отриманий мутант *P. shermanii* М-82, за допомогою якого отримують до 58 мг/л вітаміну [13].

P. shermanii найчастіше використовується на виробництві для отримання вітаміну В12, тому він є біологічним агентом для дипломного проекту.

2.1.1.1. Морфолого-культуральні ознаки *P. shermanii*

Propionibacterium shermanii – рід грампозитивних факультативних анаеробних нерухомих бактерій (рис. 2.1, 2.2).

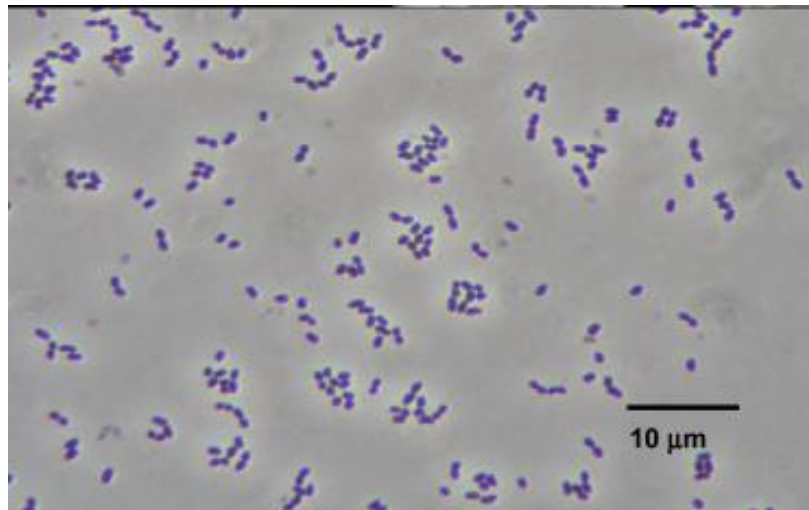


Рис. 2.1. Світлова мікроскопія *P. shermanii* (x1350)

Вони представляють собою неспороутворюючі грампозитивні нерухомі палички розміром 0,5-0,6 або 1,5-2,0 мкм (в молодих культурах – викривлені, злегка розгалужені палички, в старіших – коковидної форми) [14].

Розташовані парами або короткими ланцюжками. На твердому живильному середовищі з кукурудзяним екстрактом колонії рожевого кольору круглі, маслянисті, пастоподібні з рівним краєм діаметром 3-5 мм. На синтетичному середовищі з агар-

гаром колонії жовтувато-рожеві круглі, маслянисті, пастоподібні з рівним краєм, діаметром 1-3 мм [15].

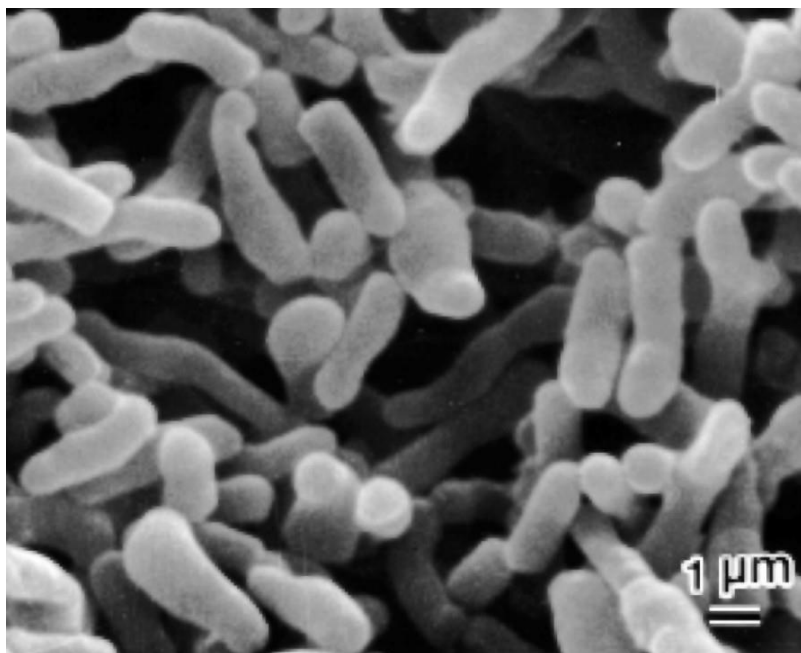


Рис. 2.2. Електронна мікроскопія колонії *P. shermanii*

На рідкому синтетичному середовищі зростання по всьому стовпчику рідини. На твердому середовищі з дріжджовим екстрактом колонії жовтувато-рожеві круглі, маслянисті, пастоподібні з рівним краєм, діаметром 2-4 мм. На рідкому середовищі з дріжджовим екстрактом зростання по всьому стовпчику рідини. На рідкому середовищі з кукурудзяним екстрактом зростання по всьому стовпчика рідини [15].

Пропіоновокислі бактерії – збудники пропіоновокислого бродіння, зброджують глюкозу, лактозу і ін. Вирощують пропіонові бактерії на різних поживних середовищах, що містять кобальт.

Оптимальна температура зростання $(29 \pm)^\circ\text{C}$, бактерії ростуть після 20-30 хвилинного прогрівання при $62,8^\circ\text{C}$. Ростуть при концентрації хлористого натрію 5,0-7,5% в дрожжесолевому бульйоні. При зростанні в дрожжеволактозному середовищі легко стають мутними. Ростуть в присутності 10% глюкози в середовищі. Оптимальний рН зростання 6,8-7,2, мінімальний 5,0, максимальний 8,0. По відношенню до кисню є факультативним анаеробом [15].

2.1.1.2. Фізіолого-біохімічні ознаки *P. shermanii*

Утилізує дуже добре декстрин, лактозу, гліцерин, глюкозу; добре – ксилозу, фруктозу; слабо – арабінозу, дульцит, мальтозу, маніт, рамнозу, сорбіт, крохмаль. Джерелами азоту можуть служити сірчаноокислий амоній, кукурудзяний екстракт, дріжджовий екстракт, амінокислоти [15].

Желатину не розріджує, початок пептонізації молока на 7-му добу, повна пептонізація на 10-ту добу, спостерігається коагуляція молока.

Відновлює нітрати, утворює каталазу. Індол не утворює. Воду з цистеїну не утворює. Володіє редуцирующою здатністю [15].

2.1.2. Поживне середовище та умови культивування *P. shermanii*

Склад поживних середовищ і умови культивування найважливіші критерії як для виробництва продуктів різного мікробного походження, будь-то дріжджі, бактерії, так і для виробництва плодових тіл сапрофітних грибів. Поживне середовище, яке використовується, повинне бути повноцінним за своїм складом бюджетне. Отже, поживне середовище повинне містити в своєму складі необхідні джерела живлення: вуглець, азот, фосфор, вітаміни, неорганічні сполуки, що містять в своєму складі калій, натрій, кальцій, магній, залізо, сірку, фосфор, марганець, цинк, кобальт, молібден, мідь, бор і ін. Присутність вітамінів в поживному середовищі позитивно впливає на ростові якості культури, тобто вітаміни є стимуляторами росту культури. Ще однією важливою вимогою до поживного середовища є його стерильність [16].

Вимоги, що пред'являються до поживних середовищ:

- містити в легко засвоюваному вигляді всі речовини, необхідні для задоволення харчових і енергетичних потреб. При культивуванні мікроорганізмів в середовища вносять фактори росту – вітаміни, деякі амінокислоти.

- бути по можливості уніфікованим, тобто містити постійне кількість окремих інгредієнтів;

- мати оптимальну концентрацію водневих іонів – рН, так як тільки при оптимальній реакції середовища, що впливає на проникність оболонки, мікроорганізми можуть засвоювати поживні речовини;

- бути ізотонічними для мікробної клітини; тобто осмотичний тиск в середовищі повинно бути таким же, як всередині клітини;

- бути стерильними, так як контамінанти перешкоджають росту основної культури, визначенню її властивостей і змінюють властивості середовища;

- володіти певним окислювально-відновним потенціалом, тобто співвідношенням речовин, які віддають і приймають електрони, що виражається індексом rH_2 . Наприклад, анаероби розмножуються при rH_2 не вище 5, а аероби – при rH_2 не нижче 10;

Найбільш елементарними прийомами, що забезпечують асептичність операції, є ретельна стерилізація середовища, повітря, обробка основного обладнання та трубопроводів гострою парою [16].

Пропіоновокислі бактерії займають одне з центральних місць серед продуцентів вітаміну. Природні штами синтезують 1,0-8,5 мг/л кориноїд, промисловий мутант М-82, який використовується в якості продуцента, утворює до 58 мг / л вітаміну.

Для росту *Propionibacterium shermanii* найбільш сприятливою є нейтральне середовище, тому по ходу процесу щодня, а іноді і частіше виробляють нейтралізацію утворених кислот. Оптимальною зоною рН для зростання є зона між 6,3-7,5. Найбільша кількість вітаміну В12 накопичується в середовищах, де рН культуральної рідини підтримувався на рівні 6,8-7,5. Значно гірші результати були отримані, коли процес йшов при більш низьких величинах рН. Вихід вітаміну залишався зниженим навіть в тому випадку, якщо після 72 год рН підвищувався до 6,8 і 7,5. Таким чином, активний біосинтез вітаміну В12 відбувається в досить вузькій зоні рН, а зростання бактерій відбувається при значно більш широких інтервалах рН.

Найбільша кількість вітаміну В12 утворюється при культивуванні бактерій в виключно анаеробних умовах. Особливо шкідливий вплив на біосинтез вітаміну В12 надає вирощування бактерій в аеробних умовах протягом перших 50 год. Що

стосується зростання, то при аеробних умовах бактерії накопичують не менш біомаси, ніж при анаеробних [17].

Продуценти вітаміну B12 культивують в середовищах, приготованих на основі харчової сировини: соєвого борошна, рибного борошна, м'ясного та кукурудзяного екстракту.

В Україні медичні препарати вітаміну отримують з використанням мутантних штамів *Propionibacterium shermanii* і *Propionibacterium freudenreichii*, які здатні синтезувати більше 10 мг / л цільового продукту. Культивування пропіоновокислих бактерій здійснюється періодичним способом на середовищах складного складу, що містять кукурудзяний екстракт, глюкозу, солі кобальту, сульфат амонію. Обов'язковою умовою високого виходу вітаміну є наявність в середовищі попередника вітаміну – 5,6-діметилбензimidазола (23, 5,6-ДМБ). Виділення цільового продукту здійснюється екстракцією розчинником, сорбції на іонітах, осадженням або поєднанням цих способів.

Вихідну культуру підтримують на твердому живильному середовищі склад якого наведений в табл. 2.2. рН середовища після стерилізації – 6,8-7,0 .

Таблиця. 2.2.

Склад стандартного поживного середовища

Компонент	Маса, г
глюкоза	20
кукурудзяний екстракт	20
амоній сірчаноокислий	2
кальцій вуглекислий	20
хлористий кобальт	0,005
вода	1000

Далі готують посівний матеріал шляхом послідовного розмноження бактерій спочатку в пробірках по 30 мл, потім в колбах по 500. Приготування посівного матеріалу проводять в анаеробних умовах протягом 2-4 діб при 30 °С.

Багатоступінчастість цього процесу пов'язана з великою витратою посівної культури на засів (10-20 об.% від обсягу середовища). В іншому випадку зростання бактерій сповільнюється, що може призвести до низького рівня накопичення вітаміну і зараження сторонньої мікрофлорою [18].

2.2. Методи досліджень

2.2.1. Методи контролю процесу культивування

Усі необхідні параметри в процесі виробництва контролюються автоматично і в динаміці. Виробничий етап – це сукупність послідовних операцій від початку функціонування об'єкта до завершення процесів росту, біосинтезу або біотрансформації, які можуть бути обумовлені вичерпанням компонентів живильного середовища старінням культури, зміненням характеристики об'єкта тощо. Для цього необхідно контролювати десятки фізикохімічних параметрів середовища культивування, кількість яких може змінюватись залежно від завдання виробництва. За необхідності, у разі відхилення від заданих характеристик проводиться їх корегування: внесення необхідних компонентів, або їх видалення [19].

Параметри середовища культивування, що контролюються:

- рН середовища та окислювально-відновлювальний потенціал;
- тиск та температура у біореакторів;
- рівень та маса середовища;
- культивування;
- рівень рідини та газів;
- швидкість обертання мішалок (для регуляції рівня піни);
- концентрація катіонів і аніонів;
- концентрація солей у живильному середовищі;
- концентрація газів у повітрі.

Серед завдань, які необхідно вирішувати на виробничому етапі, можна розділити наступні:

- Створення і контроль умов росту культур (температурний режим, масо- і газообмін, якості поживного середовища – зменшення поживних речовин і збільшення продуктів метаболізму);

- Рівень піноутворення;
- Підтримання і контроль стерильності умов середовища;
- Відсутність сторонньої мікрофлори в поживному середовищі;
- Концентрація ферментів і білків у культуральній рідині.

У процесі культивування безперервно змінюється температурний режим, тому постійно потрібно або відводити тепло, або (навпаки) підігрівати поживне середовище. Так, у аеробних умовах відбувається тепловиділення, причому чим вище інтенсивність росту культури, тим більша швидкість розігріву культуральної рідини. Найбільш простим способом відводу тепла є застосування оборотної води через змійовики, водяні сорочки тощо. Дещо простіше здійснювати контроль підвищення температури: існують різні системи підігріву – електричні, водяні [20].

Важливою особливістю біологічних об'єктів є їхня неоднорідність. Рідке середовище, у якому культивують мікроорганізми, теж є гетерогенним, бо в ньому є рідкі, тверді і газоподібні компоненти. У процесі життєдіяльності клітини утилізують частину компонентів із середовища і постійно виділяють екзометаболіти, тобто вони самі створюють гетерогенність хімічного і газового складу. Таким чином сам об'єкт постійно створює відхилення від оптимальних для нього умов функціонування. Завдання біотехнолога забезпечити максимальну продуктивність об'єкта в штучних умовах шляхом усунення факторів «самознищення». Забезпечення необхідного масо- і газообміну перемішування культур – це складне завдання, тому, що інтенсивне перемішування призводить до активного піноутворення, яке є вкрай небажаним явищем. Використання піногасників [47] призводить до проблем, пов'язаних з їх побічною дією і дотримання стерильності.

Забезпечення киснем (аеробних культур) – за рахунок високої розчинності кисню у воді, або шляхом підвищення парціального тиску кисню у газі. (парціальний тиск – це тиск газу або пари у суміші, який мав би цей газ або пара, якщо він один займав увесь об'єм у суміші). Необхідний постійний контроль складу у середовищі

культивуванні, вмісту кисню, вуглекислого газу, а за необхідності регулюється інтенсивність перемішування.

Склад і якість живильного середовища, які динамічно змінюються, що виражається у зменшенні вмісту корисних для клітин речовин і неперервному зростанню продуктів метаболізму (екзометаболітів). Крім того, компоненти, що входять до складу поживного середовища, можуть змінюватися з неоднаковою швидкістю, що призводить не тільки до збіднення складу, але й до змінення співвідношення між компонентами. Контроль складу культурального середовища одна з найскладніших задач виробничого етапу. Також потрібно стерилізувати поживне середовище в процесі культивування [21].

Культивування мікроорганізмів може здійснюватися у відкритій (безперервне культивування) чи закритій системах (періодичне культивування).

Система називається закритою, якщо жодна складова частина цієї системи після початку процесу в біореакторі не вводиться і не виводиться. У періодичному процесі в ферментер спочатку подають всі поживні речовини і посівний матеріал. Процес йде відповідно до кривої росту мікроорганізмів з заключним уповільненням реакції, обумовленим недостатньою кількістю субстрату, накопиченням токсичних метаболітів, несприятливою зміною фізико-хімічних умов навколишнього середовища (рН, температура, парціальний тиск, кисень, в'язкість), загибеллю та лізисом мікроорганізмів.

Періодичний процес включає: а) стерилізацію середовищ, біореакторів та допоміжного обладнання; б) завантаження апарату живильним середовищем; в) внесення посівного матеріалу (клітин, спор); г) ріст культури, який може збігатися в часі з наступним етапом або передувати йому; д) синтез цільового продукту; е) відділення і очищення готового продукту. Мова йде про обмежені в часі послідовності етапів, по закінченні останнього етапу біореактор очищується і його готують до нового циклу.

Під час культивування всі параметри безперервно змінюються. Розвиток керованих періодичних процесів призвело до створення об'ємнодоливної системи: в процесі культивування головні компоненти середовища додають по частинам, чим

виключають субстратне інгібування. Рідкі компоненти з середовища не відводять. Широко застосовують періодичне культивування з підживленням: внесення поживного субстрату в реактор до введення в нього біооб'єкту, в процесі культивування в апарат додають поживні речовини через певні проміжки часу порціями або безперервно «по краплях». Іноді додатково вносять біооб'єкти.

Існує також від'ємнодоливне культивування, коли частина обсягу з біореактора час від часу вилучається при додаванні еквівалентного об'єму середовища. Це призводить до регулярного омолодження культури і до затримки переходу до фази відмирання. Такий режим культивування значною мірою уподібнюється безперервному процесу, тому називається також напівбезперервним культивуванням. При отриманні мікробних білкових препаратів часто застосовують безперервне культивування як більш економічне і легше контрольоване. Концентрація поживних речовин навколо клітини повинна знаходитись в межах допустимої області і не сприяє побічним реакціям, які можуть призвести до утворення осаду на стінках ферментера [22].

Відкриті системи працюють в безперервному потоці. Забезпечується безперервний приплив свіжого живильного середовища в біореактор і відтік з нього культуральної рідини з клітинами і продуктами їх життєдіяльності. В одиницю часу субстрату вводять не більше, ніж може переробити культура. Проводять безперервне культивування принаймні з однією лімітуючою речовиною. Регулювання здійснюють підтриманням концентрації біомаси або продукту на постійному рівні шляхом зміни концентрації субстрату (турбідостат) або застосування точно лімітованої концентрації поживних речовин з відповідною зміною концентрації клітин або продукту (хемостат). У безперервних процесах культура постійно підтримується в експоненційній фазі росту. Фундаментальним принципом безперервних процесів служить рівновага між приростом біомаси за рахунок поділу клітин і їх зменшенням у результаті розведення свіжим поживним середовищем [23].

У середовищі культивування контролюють такі параметри:

- температура – термометром;

- рН середовища - за допомогою рН-електродів (скляний, мембранний електрод);

- тиск – за допомогою мембранних манометрів, що дають пневматичний сигнал, який перетворюється в електричний);

- в'язкість середовища – оцінюють потужність, яка потребує мішалка за різної швидкості обертання;

- вміст кисню – за допомогою гальванічних (потенціометричних) або полярографічних (електрод Кларка) зондів (вимірюється парціальний тиск) [24].

До механічних методів стерилізації відносять стерильну фільтрацію з використанням глибинних і мембранних фільтрів.

Своєрідною хімічною стерилізацією є газова стерилізація із застосуванням стерилізаторів, що виявляють бактеріостатичний або бактерицидний ефект. Додавання консервантів також умовно можна віднести до методів хімічної стерилізації.

До фізичних методів відноситься стерилізація фізичними чинниками: теплова (термічна), радіаційна, ультразвукова, струмами високої частоти і СВЧ-випромінюванням, УФ-випромінюванням та інші.

Залежно від температурного режиму і умов проведення теплова стерилізація поділяється на: парою під тиском (автоклавування), текучою парою, тиндалізацію, повітряну стерилізацію [25].

2.2.2. Методи виділення чистої культури *P. shermanii*

В біотехнологічних виробництвах у якості одного з видів вихідних матеріалів використовують чисту культуру мікроорганізмів.

Чистою культурою (ЧК) називають популяцію, що представляє собою потомство однієї або декількох клітин одного виду мікроорганізмів. У генетичних дослідженнях користуються клонами - чистими культурами, отриманими від однієї спори або гаплоїдної клітини. У природних умовах різні об'єкти містять, як правило, змішану мікрофлору. Для діагностичних досліджень із метою з'ясування збудників

псування харчових продуктів або рівня їх контамінації потрібне виділення чистої культури.

Методи виділення ЧК можуть бути прямими й непрямими. Прямі засновані на виділенні під безпосереднім контролем через мікроскоп, наприклад метод Лінднера. Відомі методи виділення однієї клітини із суспензії мікроорганізмів за допомогою спеціальних приладів (мікроманіпулятор, мікроселектор Перфільєва) під контролем мікроскопа [26].

Однак найбільше розповсюдженим способом виділення чистих культур є непрямі методи виділення чистої культури мікроорганізмів, які засновані на ізоляції однієї мікробної клітини від маси мікроорганізмів і подальшим вирощуванням потомства цієї клітини на поживних середовищах, ізольованих від інших видів. Для посіву частіше використовують агаризовані середовища в чашках Петрі. Цей метод запропонований відомим німецьким мікробіологом Кохом і названий методом пластинчастих (або чашкових) культур Коха. Основним завданням методу є розведення концентрації мікроорганізмів у досліджуваному матеріалі з таким розрахунком, щоб при посіві його на поживне середовище вирости ізольовані колонії. Існують два основних методи розведення досліджуваного матеріалу:

- на поверхні щільного поживного середовища «методом виснажуючого посіву»;
- попереднє розведення матеріалу у фізіологічному розчині або стерильній водопровідній воді в пробірках і висів готового розведення на щільне поживне середовище [27].

Метод виснажуючого посіву на поверхні щільного середовища використовується для виділення чистих культур аеробних і факультативно анаеробних мікроорганізмів. З цією метою для посіву беруть ряд чашок Петрі із щільним середовищем. У першу чашку наносять досліджуваний матеріал і розподіляють його по поверхні шпателем Дригальського або бактеріологічною петлею, рухаючи ними зигзагоподібними рухами зверху у низ. Потім, не стерилізуючи шпатель (або петлю), роблять посів послідовно на поверхню

середовища в інших чашках. Кількість матеріалу, внесеного в середовище, при цьому послідовно убуває (виснажуючий посів) [28].

Метод попереднього розведення досліджуваного матеріалу в стерильній водопровідній воді (або фізіологічному розчині) використовується для виділення чистих культур мікроорганізмів, як аеробних, так й анаеробних. Готують розведення матеріалу в 10-100 разів і більше (залежно від передбачуваного рівня контамінації мікроорганізмами) та роблять посів розведень, користуючись поверхневим або глибинним методом [29].

Посів в рідке середовище можна проводити петлею або піпеткою (пастерівською або градуйованою). Обидві пробірки тримають в нахиленому стані, щоб не намочити ватні пробки. Петлю з мікробним матеріалом занурюють безпосередньо в стерильне середовище та ополіскують. При внесенні клітин, узятих петлею із щільного середовища, матеріал розтирають по стінці пробірки у верхнього краю рідкого середовища, увесь час змиваючи його середовищем. В пробірці з м'ясо-пептонним агаром посів бажано проводити уколом.

Якщо розведення досліджуваного матеріалу виконано правильно, на поверхні середовища або на його товщі (залежно від методу посіву) утворюються ізольовані колонії мікроорганізмів, видимі неозброєним оком. Кожна колонія складається із клітин одного виду, однак для виділення чистої культури необхідно пересіяти колонію на окреме середовище, тобто ізолювати її від мікроорганізмів інших видів.

Методика пересіву наступна:

1. В ліву руку беруть дві пробірки – одну зі стерильним середовищем, іншу – з культурою та тримають в нахиленому положенні. В правій руці великим та вказівним пальцем тримають бактеріальну петлю та стерилізують над полум'ям пальника.

2. Виймають ватні пробки з обох пробірок, притискують їх до долоні мізинцем та безіменним пальцем правої руки та обпалюють краї пробірок.

3. Петлю вводять в пробірку з мікробною культурою, яку пересіваємо. Обережно, не торкаючись стінок, відбирають краплю рідкої культури. Якщо роблять пересів з косою агару, то для охолодження петлі спочатку слід доторкнутися

до поверхні агару, вільної від мікроорганізмів, після чого беруть невелику кількість мікробної маси зі скошеного щільного середовища.

4. Вводять петлю з матеріалом в пробірку зі стерильним рідким середовищем, намагаючись не зачепити стінок пробірки. При посіві на скошені поживні середовища петлю з клітинами мікроорганізмів занурюють майже до дна, де накопичуються найбільша кількість конденсаційної води. Трохи торкаючись петлею поверхні щільного середовища, але не розрихлюючи його, проводять від дна в верх штрих.

5. Петлю виймають, обпалюють краї пробірки та внутрішні краї пробок, після чого пробірки закривають.

6. Петлю знову обпалюють в полум'ї пальника.

7. На пробірці роблять надпис: назва культури та дату посіву.

Завершальним етапом виділення чистої культури мікроорганізмів невідомого виду є перевірка її чистоти на ізольованому середовищі візуально (перегляд посіву неозброєним оком) і мікроскопією мазка. Видова назва чистих більшості мікроорганізмів шляхом вивчення культур устанавлюють шляхом вивчення морфологічних, культуральних і фізіологічних властивостей [30].

Морфологічні властивості досліджують при мікроскопії прижиттєвих або фіксованих пофарбованих препаратів. Морфологічна характеристика мікроорганізму повинна включати форму клітин, їх скупчення й розміри, рухливість, здатність до утворення спор, наявність включень. При описі морфології слідє вказувати вік культури, склад середовища, умови культивування.

Культуральні властивості мікроорганізмів устанавлюють по особливостях росту на поживних середовищах. На рідких поживних середовищах відзначати характер розподілу культури рівномірне, помутніння Викликаючи середовища, придонне або поверхневе, що обумовлено відношенням мікроорганізмів до кисню повітря. Мутність середовища може бути пластівчастої, однорідної. Плівка-тонкою, щільною й пухкою, гладкою, зморшкуватою або складчастою. Осад бідним або рясним (кількість); щільним, пухким, слизуватим (консистенція) [31].

На щільних поживних середовищах досліджують характер колоній. Оскільки колонія утвориться в результаті розмноження однієї клітки, та будова від

особливостей розподілу клітин виду залежить даного виду мікроорганізмів. Найбільше типово видові ознаки виражені у поверхневих колоній:

- форму, профіль. блиск і колір визначають візуально;
- край і структуру - при малому збільшенні мікроскопа;
- консистенцію (м'яка, слизувата, тягуча або тендітна) визначають дотиком до її поверхні петлею;
- розміри з звичайною лінійкою або окулярним мікрометром при малому збільшенні мікроскопа (колонії крапкові – менш 1 мм у діаметрі, дрібні – 1-2, великі – більше 4 мм).

Фізіологічні властивості мікроорганізмів обумовлені ферментативною активністю й, отже, виражають особливості обміну речовин клітини. Це важлива диференціальна ознака, що використовується при ідентифікації бактеріальних і дріжджових видів.

Розповсюдженим методом вивчення фізіологічних властивостей мікроорганізмів є вирощування їх на диференційно-діагностичних середовищах, що дозволяє визначити біохімічну активність мікроорганізмів відносно речовин, введених в середовище [32].

2.2.3. Визначення біомаси *P. shermanii*

Метод широко застосовують для оцінки росту мікроорганізмів в рідких живильних середовищах. Можна використовувати його і для визначення маси клітин, вирощених на щільному живильному середовищі, проте в цьому випадку мікроорганізми необхідно заздалегідь ретельно змити з поверхні середовища фізіологічним розчином або водою і перевести в суспензію. Метод не може бути використаний при культивуванні мікроорганізмів на середовищах, до складу яких входять з'єднання, не розчинні у воді. Визначення біомаси складається з трьох послідовних операцій: доведення маси центрифужних пробірок або фільтрів до постійного значення, відділення клітин мікроорганізмів від культуральної рідини, визначення їх маси. Найчастіше визначають масу сухих клітин, хоча іноді можна

обмежитися визначенням сирої біомаси. У останньому випадку перший етап відпадає; достатньо тільки зважити центрифужну пробірку (фільтр), але не доводити її масу до постійного значення. Біомасу звичайно виражають в грамах або міліграмах на літр культуральної рідини [33].

2.2.3.1. Виділення мікроорганізмів центрифугуванням або фільтрацією

Доведення маси центрифужних пробірок або фільтрів до постійного значення. З цією метою фільтри, заздалегідь встановлені у відкриту чашку Петрі, або центрифужні пробірки поміщують в сушильну шафу і висушують протягом 1—2 год. при температурі 80—85°C і 90—100°C відповідно. Потім чашку Петрі з фільтрами або центрифужні пробірки виймають з сушильної шафи і переносять в ексикатор з безводним хлористим кальцієм (CaCl_2) або концентрованою сірчаною кислотою. Ексикатор ставлять біля аналітичних вагів, на яких проводитиметься зважування. За годину фільтри (центрифужні пробірки) зважують з точністю до 0,0001 г. Висушування і зважування повторюють, дотримуючи вказану послідовність операцій, поки маса не досягне постійного значення, тобто коливання в її визначеннях не перевищать $\pm 0,0001$ г [34].

Відділення мікроорганізмів від середовища можливе центрифугуванням або фільтруванням. Центрифугуванням відділяють звичайно бактерії. Для цього в центрифужну пробірку наливають точно зміряний об'єм ретельно перемішаної рідкої культури, котрий в залежності від її густини коливається від 5 до 20 мл. Час центрифугування і число обертів залежать від розмірів клітин. Чим вони менше, тим більше потрібно оборотів і тим продовжуючи повинен бути час центрифугування. Найчастіше центрифугують 15—20 хв при 5—10 тис. обертів в хв. Після центрифугування рідину обережно зливають, осад промивають злегка підкисленою дистильованою водою (1 мл концентрованої HCl на 1 л води) і знов центрифугують при тому ж числі обертів. Супернатант зливають негайно після зупинки центрифуги. Інакше частина осаду може бути втрачена. Міцелій актиноміцетів і грибів відділяють фільтруванням. Паперовий фільтр поміщають в скляну воронку і фільтрують через

нього точно виміряний об'єм культури, від 5 до 10 мл. Осад на фільтрі багато разів промивають підкисленою дистильованою водою.

Для відділення бактерій використовують мембранні фільтри. Розміри пор мембранного фільтру повинні бути менше величини клітин, біомасу яких визначають. Мембранний фільтр поміщають на пористу пластинку спеціального утримувача, вставленого в колбу. Щоб прискорити фільтрування, колбу підключають до водоструменевого насосу. Осад кілька разів промивають підкисленою дистильованою водою [35].

Визначення біомаси. Щоб визначити масу сухих клітин, центрифужну пробірку або фільтр з осадом клітин мікроорганізмів поміщають в сушильну шафу, висушують і зважують.

Режим висушування і зважування такий, який використовували і при визначенні маси пробірок або фільтрів. Суху біомасу визначають по формулі 2.1:

(2.1.)

$$M = \frac{(A - B)1000}{V}$$

де M — суха біомаса в г/л; A — маса центрифужної пробірки (фільтру) з осадом в г; B — маса центрифужної пробірки (фільтру) без осаду в г; V — об'єм культуральної рідини, узятий для центрифугування (фільтрування) в мл.

Точність методу визначається повнотою відмивання клітин від компонентів середовища і ретельністю зважування [36].

2.2.3.2. Визначення кількості клітин і біомаси нефелометричним методом

Оптичний (нефелометричний) метод визначення біомаси знайшов широке застосування в лабораторних мікробіологічних дослідженнях, оскільки дозволяє швидко і досить точно визначити концентрацію клітин в суспензії або культуральній рідині.

У основі методу лежить вимірювання зменшення кількості світла при його проходженні через суспензію клітин. У певних межах воно обумовлене переважно розсіянням світла клітками і пропорційно їх концентрації. Величина цього показника залежить від багатьох чинників (форми і розмірів клітин, оптичних властивостей культурального середовища, довжини хвилі падаючого світла і т. д.). Тому нефелометричний метод придатний лише для тихий мікроорганізмів, зростання яких викликає рівномірне помутніння середовища і не супроводжується помітною зміною форми і розмірів клітин, утворенням міцелію, плівок або інших скупчень [37].

Живильне середовище для культивування мікроорганізмів, в якій передбачається визначати число клітин по світорозсіюванню, повинне бути оптично прозорим. Якщо каламутність середовища пов'язана з випаданням в осад деяких солей, найчастіше фосфатів, то перед вимірюванням світорозсіювання її підкисляють декількома краплями концентрованої соляної кислоти.

Зміну інтенсивності світла при проходженні через суспензію клітин вимірюють за допомогою фотоелектроколориметра (ФЕК) або спектрофотометра, вибираючи довжину хвилі (звично в інтервалі 540—650 нм), при якій поглинання світла даною суспензією клітин є мінімальним. Так, розсіяння світла, що викликається суспензією клітин в м'ясо - пептонному бульйоні або суслі, найбільш зручно вимірювати з червоним фільтром, при якому оптична густина таких середовищ мінімальна. При високих концентраціях клітин в культуральному середовищі відбувається вторинне розсіяння світла, що приводить до отримання занижених результатів. Тому суспензії великої густини перед, вимірюванням світорозсіювання слід розводити середовищем або водою. Розбавлення проб однієї і тієї ж культури різними рідинами неприпустимо, оскільки набухання і стиснення клітин впливає на величину світорозсіюванні [38].

Правила роботи на фотоелектроколориметрі і порядок вимірювання величини світорозсіювання детально висловлені в інструкції, прикладеній до приладу. У деяких випадках густину клітинної суспензії виражають в свідченнях нефелометра. Проте частіше будують калібрувальні криві залежності між величиною світорозсіювання і числом клітин або сухою біомасою в одиниці об'єму. Для побудови калібрувальної

кривої поступають таким чином. Вимірюють величину світлорозсіювання суспензій з різним змістом клітин і в кожній з їх визначають одним з вживаних методів кількість кліток або біомасу. Одержану залежність виражають графічно, відкладаючи на осі ординат свідчення ФЕК, а на осі абсцис — кількість кліток, що містяться в 1,0 мл суспензії, або біомасу в г/л. Для шкірного мікроорганізму слід будувати свою калібрувальну криву [39].

2.3. Висновки до розділу

У фармакологічній промисловості для виробництва вітаміну В12 переважно використовують пропіоновокислі бактерії. Активно продукують вітамін В12 представники роду *Propionibacterium*. Природні штами пропіоновокислих бактерій утворюють 1,0 – 8,5 мг/л кориноїдів, але отриманий мутант *P. shermanii* М-82, за допомогою якого отримують до 58 мг/л вітаміну.

P. shermanii найчастіше використовується на виробництві для отримання вітаміну В12, тому він є біологічним агентом для дипломного проекту. *Propionibacterium shermanii* – рід грампозитивних факультативних анаеробних нерухомих бактерій.

Культивування пропіоновокислих бактерій здійснюється періодичним способом на середовищах складного складу, що містять кукурудзяний екстракт, глюкозу, солі кобальту, сульфат амонію.

Найбільше розповсюдженим способом виділення чистих культур є непрямі методи виділення чистої культури мікроорганізмів, які засновані на ізоляції однієї мікробної клітини від маси мікроорганізмів і подальшим вирощуванням потомства цієї клітини на поживних середовищах, ізольованих від інших видів. Відділення мікроорганізмів від середовища можливе центрифугуванням або фільтруванням. Оптичний (нефелометричний) метод визначення біомаси знайшов широке застосування в лабораторних мікробіологічних дослідженнях, оскільки дозволяє швидко і досить точно визначити концентрацію клітин в суспензії або культуральній рідині.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Підбір оптимального складу поживного середовища для отримання вітаміну B12

Одним з завдань дипломної роботи було вдосконалити поживне середовище для отримання достатньої кількості живих клітин *P. shermanii*.

В літературному обзорі показано, що пропіоновокислі бактерії є активними продуцентами вітаміна B12. Потрібно відмітити, що синтез вітаміна залежить від умов культивування. Ферментація промислового вітаміну B12 по *P. shermanii* зазвичай використовують сахарозу або глюкозу в якості єдиного джерела вуглецю, що призводить до збільшення витрат середніх. Для того щоб зменшити вартість ферментації, це має вирішальне значення, і необхідно використовувати недорогий і зручний сировини в якості альтернативного середнього субстрату для промислового вітаміну B12 виробництва.

Відомо, що кориноїди включають в групу тетрапірольних з'єднань, що несуть життєво важливі функції. Іони металів і цих з'єднань знаходяться в комплексі з органічними лігандами, а в коферментах B12 атом кобальту зв'язаний з вуглеводом. Ко-B12 – єдине металоорганічне з'єднання, виявлене в живих організмах. Це унікальний біокаталізатор [40].

Проте в натуральних поживних середовищах вміст кобальту 0.005 г/л. Тому подальше дослідження направлене на вивчення впливу іонів кобальту на вихід біомаси і на синтез вітаміну B12. Кобальт вносили в кількості 0,002 г/л, 0,003 г/л, 0,004 г/л. В якості контролю – середовище, в яке не вносили кобальт [29]. Результати представлені на (рис 3.1 – 3.2).

Слід зазначити, що внесення в живильне середовище іонів кобальту дещо гальмує біохімічні процеси.

Ймовірно, внесення в живильне середовище іонів кобальту збільшує синтез вітаміну В12 і, як наслідок, йде зниження швидкості росту пропіоновокислих бактерій.

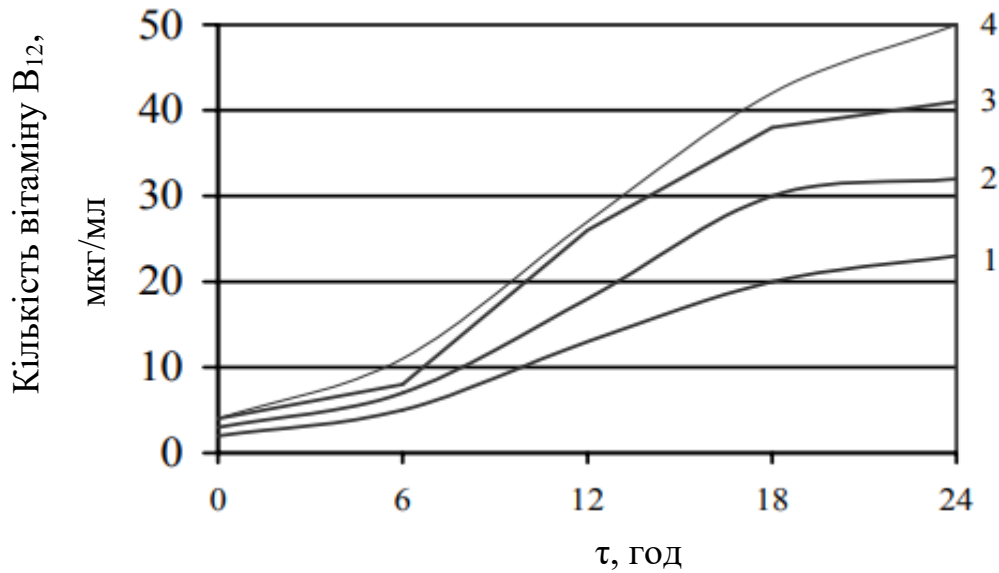


Рис.3.1. Вплив концентрації іонів кобальту на синтез кобаламіну
 1 – контроль; 2 – 0,002 г/л; 3 – 0,003 г/л; 4 – 0,004 г/л.

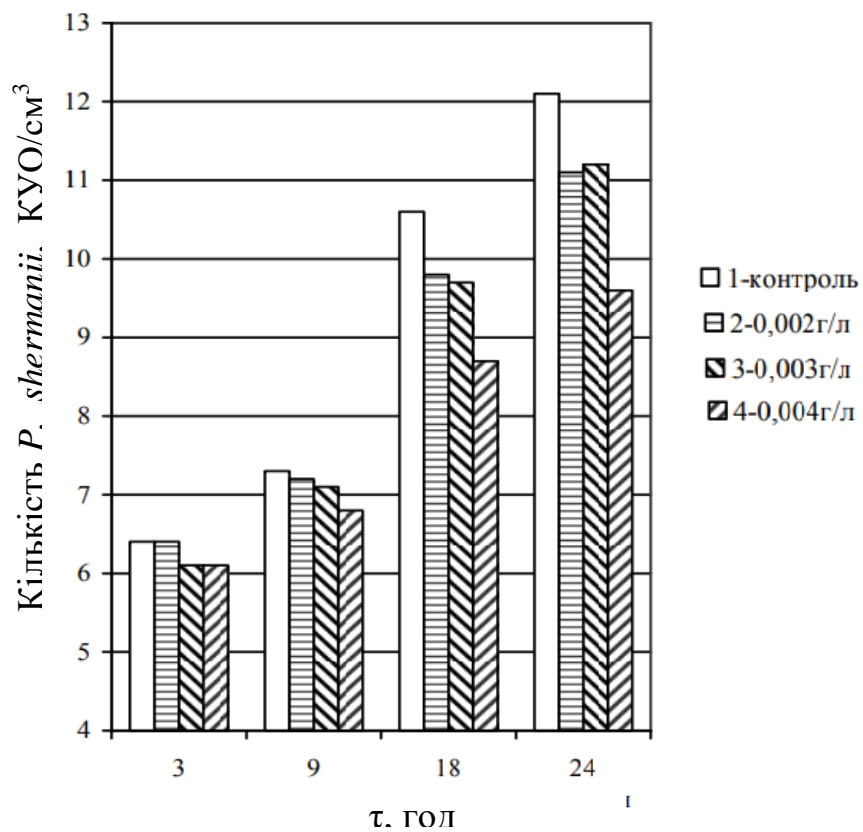


Рис. 3.2. Вплив вмісту іонів кобальту на ріст *P. shermanii*

Кількість клітин в зразку, що містить 0,004г / л кобальту, до кінця культивування склало $8 \cdot 10^9$ в 1 см^3 , що на 3 порядки менше, ніж в контролі. Відзначено зниження темпу нарощування біомаси в цьому ж зразку на 20% в порівнянні з контролем. Найбільш наближені до контролю значення ми отримали в другому і третьому зразках, що містять 0,002 г / л і 0,003 г / л іонів кобальту. Кількість життєздатних клітин до кінця культивування досягло $8 \cdot 10^{10}$ в 1 см^3 , $6 \cdot 10^{10}$ в 1 см^3 відповідно. Також в цих зразках спостерігається найменша різниця в значеннях оптичної густини з контрольним зразком на 7 і 12,5% [41].

Можна припускати, що для синтезу вітаміну крім цілісності клітинних структур необхідний певний рівень, таких метаболітів, як сукцинил КоА, гліцин, метіонін, НАД, АТФ, ГТФ. Тому при культивуванні пропіоновокислих бактерій виникає щось подібне до конкуренції процесу біосинтезу вітаміну B_{12} і інших анаболічних процесів за загальні попередники, бо АТФ, НАД, ФАД входять в молекулу вітаміну як структурні одиниці [30].

Склад поживного середовища для культивування *P. shermanii* наведений в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1

Склад поживного середовища для культивування *P. shermanii*

Компонент	Склад поживного середовища	Склад вдосконаленого поживного середовища
глюкоза	20	20
кукурудзяний екстракт	20	20
амоній сірчаноокислий	2	2
кальцій вуглекислий	20	20
хлористий кобальт	0,005	0,003
вода	1000	1000

В результаті досліджень підібрана оптимальна доза іонів кобальту в кількості 0,003 г / л, яка дозволяє отримати біомасу не тільки з високим вмістом вітаміну B_{12} ,

але і буде містити достатню кількість життєздатних клітин пропіоновокислих бактерій [31].

3.2. Технологічна схема отримання вітаміну В12

Біотехнологічний процес виробництва вітаміну В12 можна зобразити у вигляді схеми, яка представлена в додатку А.

Посівний матеріал готують спочатку в пробірках по 30 мл, потім в колбах по 500 мл і послідовно в ферментерах ємністю 100 і 1000 л. Приготування посівного матеріалу проводять в анаеробних умовах протягом 2-4 діб при 30°С на середовищі аналогічного складу до накопичувального з додаванням 0,003 г хлористого кобальту. Попереднє вирощування культури для виробництва вітаміну В12 займає до 18 діб. Заключну ферментацію проводять також в анаеробних умовах [42].

Ферментація проходить у дві фази. Перша триває 67 год (з моменту засіву середовища культурою бактерій до внесення 5,6-ДМБ) і протікає в строго стерильних умовах при 28-30 ° С. При цьому відбувається розмноження бактерій з інтенсивним наростанням біомаси (50-55 год ферментації), супроводжуване утворенням пропіонової і оцтової кислот, які нейтралізуються додаванням 40% розчину їдкого натру або аміачної води, підтриманням рН на рівні 6,5-7,0. У першій фазі *P. shermanii* накопичує в основному (80% і більше) який не містить нуклеотидного підстави попередник вітаміну В12 (фактор В), а також деяку кількість повних кориноїд, в тому числі кобаламін (8-10%), псевдовітамін В12 і фактор А [43].

Трансформація цих продуктів в активну для людини і тварин форму вітаміну В12 (кобаламін) відбувається в другій фазі ферментації в результаті внесення в середу 5,6-ДМБ (10-20 мг / л) в умовах аерації (2 м³ / год). За цей час фактор В і частина інших аналогів вітаміну В12 переводяться в кобаламін, що містить в нуклеотидної частини молекули доданий азотистих основ. ЯЖ містить до кінця процесу до 30 мг / л вітаміну В12, накопиченого в клітинах бактерій.

Для екстрагування вітаміну клітини нагрівають при 80-120 ° С протягом 30 хв при рН = 6,1 ÷ 8,5.

Перетворення в кобаламін досягають, обробляючи гарячий розчин або клітинну суспензію ціанідом або тіоціанатом, часто в присутності NaNO_2 або хлораміну В12.

Кориноїд сорбують на різних носіях: амберліт IRC-50, Al_2O_3 , активному вугіллі і елююють водними спиртами або водно-фенольними сумішами [33].

З водних розчинів кориноїд екстрагують спиртом, фенолом або крезолу, або сумішшю цих фенолів з бензином, бутанолом, тетрахлорид вуглецю або хлороформом [44].

Основні точки контролю. Важлива умова нормального процесу бродіння – контроль рівня жирних кислот і амонійного азоту. Вітамін В12 нестійкий при тепловій обробці, особливо в лужному середовищі. Тому перед випарюванням до метанової бражки додають HCl до оптимального значення рН 5,0-5,3 і сульфат Na (оптимальний вміст 0,07-0,1%) [45].

Вихід продукту зазвичай становить 50-60% від його вмісту у вихідній культуральній рідині. До кристалічного вітаміну В12 додають воду для ін'єкцій.

3.2.1. Приготування води для ін'єкцій

Вода для фармацевтичних цілей відноситься до ключових елементів, які забезпечують безпеку виготовляються лікарських засобів. Без застосування води самої різної якості не обходиться практично жодне фармацевтичне підприємство або аптека. Вона може використовуватися як сировина, допоміжний матеріал, а так само як енергоносії на різних стадіях технологічного процесу і для різних цілей.

Залежно від якості вихідної води, її хімічного складу, можливих домішок (механічні та колоїдні частинки, мікроорганізми, бактеріальні ендотоксини і ін.) Існує кілька типів води, що відрізняються за вимогами до її чистоті. Вітчизняної нормативною документацією, яка регламентує вимоги до води для фармацевтичних цілей, є фармакопейні статті «Вода очищена», «Вода для ін'єкцій », « Вода для ін'єкцій в ампулах » і « Вода для ін'єкцій у флаконах » [46].

В якості основних стандартів в більшості країн світу поряд з національними фармакопеями для оцінки якості води для фармацевтичних цілей, використовуються

Європейська та Американська Фармакопеї. Найбільш повно представлена класифікація видів води для фармацевтичних цілей в Європейській Фармакопеї-1997, 4 видавництва., Додаток 4.2. 2002 року і Американської Фармакопеї XXV вид. 2002 року.

У Європейську Фармакопею-1997, 4 видавництва, 2002 року крім монографій на «Воду очищену», «Воду очищену в упаковці», «Воду для ін'єкцій », «Стерильну воду для ін'єкцій», присутніх в попередньому виданні, введена нова монографія «Вода високого ступеня очищення». Даний тип води введений після проведення в 1999 р в Страсбурзі міжнародного симпозіуму, присвяченого питанню про можливість використання зворотного осмосу для отримання води для ін'єкцій. Європейським співтовариством було вирішено, що зворотний осмос в даний час - ефективний метод отримання води очищеної, але не підходить для отримання води для ін'єкцій. Єдиним методом отримання води для ін'єкцій згідно Європейської Фармакопеї вважається дистиляція. Вода високого ступеня очищення призначена для приготування лікарських коштів, для яких потрібна вода високої біологічної якості, крім тих випадків, коли потрібна вода для ін'єкцій. На думку Європейських колег методи отримання води високого ступеня очищення менш надійні.

До води високого ступеня очищення пред'являються ті ж вимоги, що і до води для ін'єкцій (фізико-хімічні показники, мікробіологічна чистота, апірогенна). Поява нового типу води для фармацевтичних цілей було пов'язано з можливістю її використання при виготовленні різних лікарських засобів, як альтернативи воді для ін'єкцій. У фармацевтичній промисловості вода для ін'єкцій часто використовується для приготування офтальмологічних препаратів, стерильних препаратів для носа / вух, препаратів для нанесення на шкіру, оскільки вважається, що вода очищена не має досить високою якістю. У таких випадках раціональніше використовувати воду високого ступеня очищення, яка має велику біологічної чистотою [47].

В Американській Фармакопеї XXV вид. 2002 збережені монографії: «Вода для фармацевтичних цілей», «Вода очищена», «Вода для ін'єкцій», «Стерильна очищена вода», «Стерильна вода для ін'єкцій», «Стерильна вода для іригації і інгаляції» з попереднього видання.

Вибір методів і технологічних схем отримання води для фармацевтичних цілей обумовлений вимогами, що пред'являються до води фармакопейними статтями і якістю вихідної води.

Оскільки воду для фармацевтичних цілей отримують з води питної, джерелом якої є природна вода, важливим моментом є звільнення її від присутніх домішок [48].

3.2.2. Обладнання для одержання води очищеної і води для ін'єкцій

У загальному вигляді технологічна схема установки по отриманню води фармакопейної якості може бути представлена у вигляді наступних стадій виробництва (рис. 3.3).

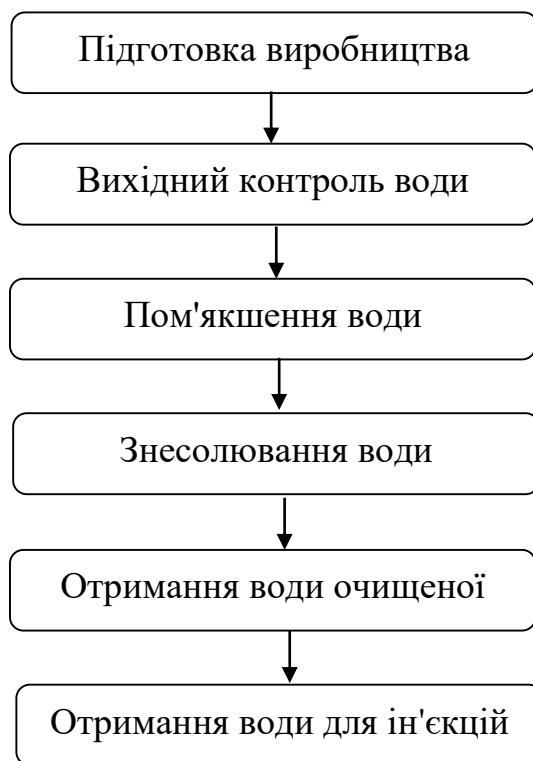


Рис. 3.3. Узагальнена технологічна схема очистки води

У промислових умовах одержання води для ін'єкцій і води очищеної здійснюють за допомогою високопродуктивних корпусних апаратів, термокомпресійних дистиляторів різних конструкцій [49].

Одним із представників колонних багатокамерних апаратів є багатоступінчасті апарати. Установки подібного типу для одержання води очищеної бувають різної конструкції. Продуктивність великих моделей досягає 10 т/год.

Найчастіше застосовуються триступінчасті колонні апарати з трьома корпусами (випарниками), розташованими вертикально або горизонтально. Особливістю колонних апаратів є те, що тільки перший випарник нагрівається паром, вторинна пара з першого корпусу надходить у другий як нагрівник, де конденсується й утворюється вода очищена. З другого корпусу вторинна пара надходить у третій як нагрівник, де також конденсується. Таким чином, воду очищену одержують з другого й третього корпусів. Продуктивність такої установки до 10 т/год дистилляту. Якість дистилляту задовільна, тому що в корпусах достатня висота парового простору і передбачене видалення краплинної фази з пари за допомогою сепараторів [50].

Трикорпусний аквадистиллятор «Фін-аква» функціонує за рахунок використання демінералізованої води (рис. 3.4).

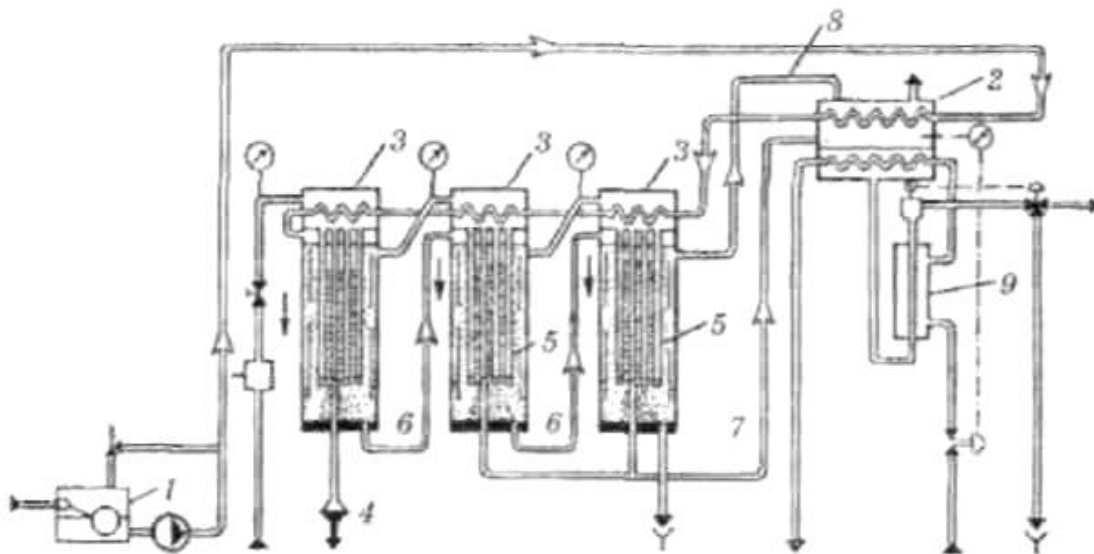


Рис. 3.4. Трикорпусний аквадистиллятор «Фін-аква» «Finnaqua-300-S-4» (Фінляндія): 1 – регулятор тиску; 2 – конденсатор-холодильник; 3 – теплообмінник камер попереднього нагрівання; 4 – парозапірний пристрій; 5 – зона випарювання; 6,7,8 – трубка; 9 – теплообмінник.

Для забезпечення апірогенності отримуваної води необхідно створити умови, які запобігають потраплянню пірогенних речовин у дистиллят. Ці речовини нелеткі і

не переганяються з водяною парою. Забруднення ними дистилляту відбувається перекиданням крапельок води або виносом їх струменем пари в холодильник. Тому конструктивним вирішенням питання підвищення якості дистилляту є застосування дистиляційних апаратів відповідних конструкцій, в яких виключена можливість перекидання крапельно-рідкої фази через конденсатор у збірник. Це досягається улаштуванням спеціальних пасток і відбивачів, високим розташуванням паропроводів відносно поверхні паротворення. Доцільно також регулювати обігрів випарника, забезпечуючи рівномірне кипіння й оптимальну швидкість паротворення, тому що надмірне нагрівання веде до бурхливого кипіння і перекидання крапельної фази. Проведення водопідготовки знесолюванням також зменшує піноутворення і, отже, виділення крапельок води в парову фазу [52].

На деяких хіміко-фармацевтичних підприємствах воду для ін'єкцій одержують за допомогою дистиллятора «Mascarini» —продуктивність цього апарата 1500 л/год. Він оснащений приладом контролю чистоти води, бактерицидними лампами, повітряними фільтрами, пристроєм для видалення пірогенних речовин, а також установкою подвійної дистиляції води продуктивністю 3000 л/год [53].

Вода надходить через регулятор тиску в конденсатор, проходить теплообмінники камерпопереднього нагрівання, а після нагрівання надходить у зону випарювання, яка складається із системи трубок, що обігріваються всередині нагріваючою парою. Нагріта вода подається на зовнішню поверхню трубок, що обігріваються, у вигляді плівки, стікає по них і нагрівається до кипіння.

У випарнику за рахунок поверхні киплячих плівок утворюється інтенсивний потік пари, що рухається знизу нагору зі швидкістю 20–60 м/с. Відцентрова сила, що виникає при цьому, забезпечує стікання крапель у нижню частину корпусу, притискаючи їх до стінок [53].

Нормативно-технічна документація пред'являє високі вимоги до чистоти ін'єкційних розчинів, що досягається їх фільтруванням. При виробництві ампулованих розчинів найчастіше використовують тонке фільтрування як основне, що передує мікрофільтруванню. Серед великої кількості фільтрувальних установок використовують нутч-, друк- фільтри, установки стерильної фільтрації [54].

Дистилятори є надійним, але в той же час недосконалим обладнанням. При неправильній експлуатації вони можуть виробляти очищену воду, яка містить пірогенні речовини, - наприклад, в разі механічних поломок або якщо вихідна вода містить забруднюючі речовини в кількостях, що перевищують можливості дистилятора щодо зниження їх рівня в готовому продукті. У разі завантаження в дистиляційну установку води, що містить велику кількість ендотоксинів (з водопроводу або обладнання для попередньої підготовки) при відсутності мембранної системи попереднього очищення, отримана в дистиляторі вода може не пройти випробування на ендотоксини. Багато успішно функціонують дистиляційні системи працюють без проведення попередньої мембранної очистки, однак деякі системи потребували модернізації - попередній підготовці з використанням зворотного осмосу (RO - reverse osmosis) або ультрафільтрації (UF - ultrafiltration), так як отримана вода періодично не проходила тест на ендотоксини з -за їх високого вмісту у вихідній воді [55].

Зберігання води для ін'єкцій. Воду для ін'єкцій зберігають при температурі від 3°С до 7°С або від 80°С до 95°С в закритих місткостях виготовлених з матеріалів, що забезпечують збереження властивостей води в межах чинних нормативних документів і що захищають її від попадання механічних включень і мікробіологічної контамінації. Тривалість зберігання встановлюється потім валідації.

При необхідності тривалого зберігання води для ін'єкцій необхідно організувати її циркуляцію при температурі в інтервалі 85-90° С. Для цього застосовуються спеціальні місткості. У якості матеріалу усіх поверхонь, що знаходяться у контакті з водою для ін'єкцій, рекомендується використовувати нержавіючу сталь 02X17H 13M2 (міжнародне позначення AISI 316L) електрополіровану з шорсткістю поверхні (Ra) не більше 0,8 мкм.

Місткість для зберігання води для ін'єкцій має бути обладнана:

- мішалкою;
- сорочкою для подачі пари і охолоджувальної води;
- системою душировання для забезпечення безперервного змочування усій внутрішній поверхні місткості (реактора);

- системою термостатування;
- гідрофобним повітряним фільтром;
- вибуховою мембраною;
- манометром;
- системою регулювання рівня.

3.3. Стадія ампулювання

В основному застосовують вакуумний і шприцевий. Параконденсаційний використовується рідко.

Вакуумний спосіб володіє великою продуктивністю, але характеризується недостатньою точністю дозування ($\pm 10-15\%$). Крім того, при вакуумному способі ампули при наповненні капілярами занурюються в дозується розчин і забруднюють капіляри. Тому після запаювання в капілярі може утворитися нагар, який може відшаруватися і потрапити в розчин. Наповнення ампул розчином проводять в вакуумних апаратах, в яких ампули в касетах знаходяться капілярами вниз і занурені в наповнюється розчин. Розчин перед цим також за рахунок вакууму подається в апарат. В апараті створюють вакуум визначального обсяг наповнення ампул розчином. При цьому повітря з ампули видаляється. Потім вакуум скидається до атмосферного тиску. Вхідний в апарат фільтроване повітря чинить тиск на розчин і заганяє його в ампулу [56].

Шприцевий спосіб проводиться за допомогою дозаторів. Під час наповнення голки дозаторів опускаються в ампули і потім піднімаються одночасно з наповненням. У методу висока точність дозування ($\pm 2\%$), капіляр не забруднюється розчином. Однак продуктивність невисока. При наповненні ампул розчином з легкоокисляючих речовиною з ампул видаляється повітря з заміною його на азот або вуглекислий газ.

Запаювання ампул (герметизація).

Основними способами запаювання ампул є способи:

- опалювальному кінчиків капілярів;

- відтягненням капілярів.

При першому способі у безперервно обертається ампули нагрівають кінчик капіляра і скло саме заплавляються отвір капіляра. ампула рухається по транспортеру, проходячи через ряд газових пальників, які нагрівають і запаюють ампулу. В автоматах для запаювання є розпилувальна форсунка для душирования капіляра апірогенної водою, щоб видалити розчин з капіляра.

При другому способі спочатку розігрівують капіляр безперервно обертається ампули, а потім відпоювали частина капіляра спеціальними механічними щипцями і, відтягуючи, отпаивают. застосовується варіант запаювання відтягнення капіляра під дією струменя стиснутого повітря [57].

На сучасному обладнанні можна проводити запаювання ампул з допомогою лазерних технологій. Всі ампули проходять контроль на якість запаювання, використовуючи три методу.

Перший метод - вакуумний. Ампули в касетах капілярами вниз поміщаються в камеру, в якій створюється розрядження. При цьому з не запаяних ампул розчин випливає.

При другому методі ампули в касетах в ємності поміщають в підфарбовану воду на 20-25хв і створюють розрядження, яке потім знімають. При неякісній запайке підфарбована вода зайде в ампулу. Такі ампули бракують.

Третій метод заснований на візуальному спостереженні за світінням газової середовища в ампулі під дією високочастотного електричного поля, яке різний залежно від залишкового тиску в ампулі.

3.4. Вдосконалена технологія очищення води для ін'єкцій

В Україні у відповідності з ДФУ для отримання води для ін'єкцій використовують спосіб дистиляції. За вихідну воду береться вода очищена.

Методи мембранного розділення, які все більше впроваджуються у виробництво. Вони здійснюються без фазових перетворень і потребують для своєї

реалізації значно менших витрат енергії, рівнозначних з мінімальною теоретично обумовленою енергією розділення [58].

Мембранні методи очищення ґрунтуються на властивостях перегородки (мембрани), що має селективну проникність, за рахунок чого можливе розділення без хімічних і фазових перетворень. Завдяки розвитку мембранної технології з'явилася можливість одержати стерильну, апірогенну воду за допомогою ультрафільтраційних установок. Такі системи очищення мають стерилізаційну установку, ультрафільтраційні мембрани та установку для озонування води, також можуть бути використані УФ-випромінювачі.

Ультрафільтраційні модулі випускають багато закордонних фірм, такі як «AsahiChemical» (Японія), «Christ» (Німеччина), «HoffmannLaRoche» (Швейцарія), «Elga» (Великобританія) та ін.

Для одержання води для ін'єкцій у практичному відношенні цікаві такі зворотноосмотичні апарати, як «Джерело-600», «СуперК'ю», «Шар'я-500М», «Osmocarb» (Великобританія) та ін.

В установці «Супер-К'ю» (продуктивністю 720 л/год) вода пропускається через вугільний фільтр, де відбувається звільнення від органічних речовин; потім – через змішаний шар іонітів; після чого надходить на патронний бактеріальний фільтр із розміром пор 0,22 мкм ($0,22 \cdot 10^{-9}$ м). Далі вода надходить на зворотноосмотичний модуль, де відбувається видалення пірогенних речовин. Отриману воду використовують для приготування ін'єкційних лікарських форм, а концентрат використовують як технічну воду або повторно відправляють на очищення [43].

Із застосуванням принципу мембранного очищення працює установка високоочищеної води «Шар'я-500М». Продуктивність цього апарата за живильною його водою 500 л/год; одержана на ньому вода – високоочищена, вільна від механічних домішок, органічних і неорганічних речовин. Вона застосовується у виробництві імунобіологічних бактерійних препаратів і для приготування ін'єкційних розчинів [59].

Установка включає блоки передфільтрації, зворотного осмосу і фінішного очищення. Блок фільтрації призначений для очищення питної водопровідної води від

механічних домішок розміром 5 мкм і включає один фільтр катіонітний і два фільтри вугільних, що працюють паралельно або взаємозамінно.

Блок зворотного осмосу працює при тискові не нижче 1,5 МПа (15 атм). Вода, що надходить на блок, розділяється після фільтрування на два потоки: один з яких проходить через зворотноосмотичні мембрани, а другий потік, що проходить уздовж поверхні мембрани і містить підвищену кількість солей (концентрат), відводиться з установки. Для нормальної роботи цього блока необхідно, щоб співвідношення об'ємів води на подачі, зливі і тієї, що проходить через мембрану, становило 3 : 2 : 1 відповідно.

Таким чином, для одержання 1 л води високоочищеної необхідно витратити приблизно 3 л води водопровідної. При цьому швидкість зливання досить висока, що запобігає шкідливому впливові концентрованої поляризації на роботу установки. У зворотноосмотичному блоці здійснюється очищення води від розчинних солей, органічних домішок, твердих суспензій і бактерій. Якість води контролюється за питомим опором за допомогою кондуктометра [60].

Після блока зворотного осмосу вода надходить в блок фінішного очищення, який включає іонообмін і ультрафільтрацію. Іонообмінне очищення води здійснюється за допомогою послідовно з'єднаних фільтрів — катіонного й аніонного, за якими встановлений змішаний катіонноаніонний фільтр, де відбувається очищення від катіонів і аніонів, що залишилися.

Остаточна доочистка води проводиться в двох ультрафільтраційних апаратах із порожнистими волокнами AP-2,0, призначених для відділення органічних мікродомішок (колоїдних частинок і мікромолекул).

Більш досконалою установкою є установка зворотного осмосу системи «Rochet» (Німеччина), яка дозволяє одержати воду трьох ступенів очищення: знесолену, очищену апірогенну та особливо чисту для ін'єкцій. Ця система одержання води дозволяє автоматично прокачувати кожні 4 год невикористану воду для збереження її апірогенності і стерильності.

Термін використання води для ін'єкцій регламентується 24 годинами з моменту отримання, за умови її збереження в асептичних умовах. При тривалішому зберіганні

вода поглинає з повітря вуглецю діоксид і кисень, може взаємодіяти з матеріалом ємності, викликаючи перехід іонів важких металів, і є середовищем для розмноження мікроорганізмів. Тому перевага віддається використанню свіжоприготованої води, яку іноді безпосередньо після дистиляції додатково кип'ятять протягом 30 хвилин.

Надійніше зберігання гарантується спеціальними системами, виконаними з інертного матеріалу, в яких вода знаходиться при високій температурі (70-90 °С), постійному тиску та перемішуванні [61].

3.4.1. Технологічна схема очистки води для ін'єкцій

Типова (узагальнена) схема напрацювання води фармакопейної якості представлена на (рис 3.7).

На стадіях зберігання води очищеної і води високоочищеної також використовуються УФ-лампи, стерильні фільтри (для очищеної) і генератор озону (якщо вимагається).

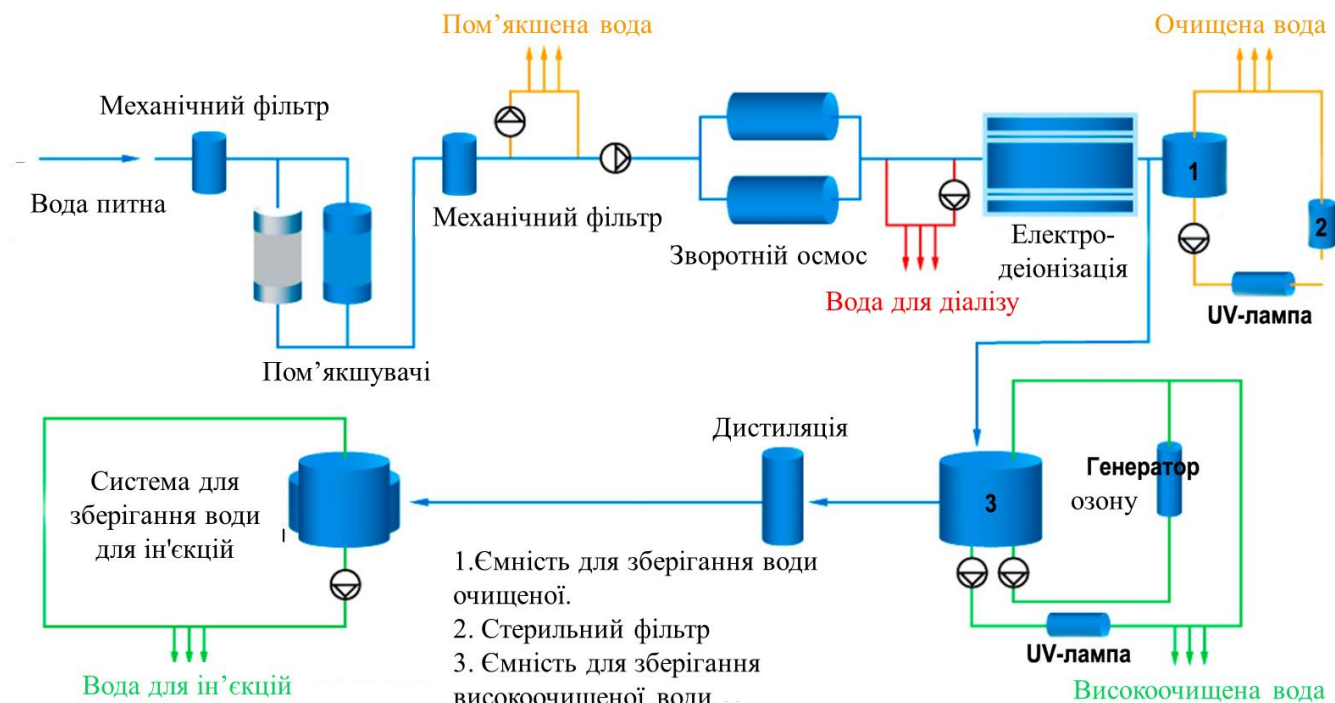


Рис. 3.7. Схема процесу отримання води фармакопейної якості (високоочищеної)

Пропонується така технологія очищення води для ін'єкцій:

1. Підігрів і термостатування. Для подальшої стадії зворотнього осмосу необхідно підтримувати температуру води в заданих межах. При низьких температурах пропускна спроможність мембрани істотно знижується, а при високій - може розчиняти смоли пом'якшувачів. Устаткуванням цієї стадії можуть бути теплообмінники із застосуванням одного з видів [62].

2. Груба фільтрація. Груба фільтрація видаляє з води частки розміром більше 100 мкм. В якості устаткування для грубої фільтрації використовуються фільтри з піщаним завантаженням. Вибір сорту піску залежить від результатів аналізу води з урахуванням сезонних змін. Фільтр періодично промивається, його справність контролюється різницею тиску води до і після фільтрації.

3. Пом'якшення. Ця стадія дозволяє знизити жорсткість води за рахунок видалення іонів кальцію і магнію, значно понизити зміст іонів перед подачею води для очищення на іонообмінники і мембрани зворотного осмосу. В якості устаткування на цій стадії можуть служити автоматичні пом'якшувачі, які працюють по принципу заміни іонів кальцію і магнію іонами натрію. Вони періодично регенеруються розчином хлориду натрію. Справність роботи пом'якшувача можна контролювати періодичним виміром жорсткості води на вході і на виході.

4. Фільтрація через вугільний фільтр. Ця стадія дозволяє понизити концентрацію органічних речовин і хлору. Використовуються стандартні патронні фільтри з активованим вугіллям. Справність фільтру контролюється різницею тиску води до і після фільтрації.

5. Зворотний осмос. На стадії зворотного осмосу вода очищається від органічних сполук і солей. Видалення домішок відбувається за рахунок пропускання води через напівпроникну мембрану при величині тиску, що перевищує осмотичне. Для збільшення ефективності процесу використовується тангенціальна подача води до поверхні мембрани при рециркуляції. Устаткування є системами мембран, які мають розміри пор 0,0005 - 0,001 мкм. Контроль здійснюється виміром питомої електричної провідності води на виході з системи [63].

6. Ультрафіолетове опромінення. Фотохімічне окислення води ультрафіолетовими променями з довжинами хвиль 185 і 245 нм усуває сліди органічних сполук і вбиває мікроорганізми у воді. Ультрафіолетове опромінення з довжиною хвилі 254 нм може бути використане також і для запобігання розмноженню бактерій в резервуарах для зберігання води для ін'єкцій. Устаткування є ультрафіолетові лампи. Правильність роботи ламп контролюється по їх випромінюючій здатності.

7. Ультрафільтрація. Призначена для видалення з води пірогенів і інших розчинених органічних речовин, молекулярна маса яких перевищує 10 000 (маса молекули, виражена в атомних одиницях маси води, яка дорівнює 18). Устаткування є системами мембран, які мають діаметр пор 0,001 - 0,05 мкм. Речовини, що затримуються ультрафільтраційною мембраною, розташовуються в області молекулярних мас від 10 000 до 1 000 000. Вода проникає через мембрану, тоді як забруднення затримуються. Правильність роботи системи контролюється по різниці тиску води до і після ультрафільтрації.

8. Деіонізація. Дозволяє очистити воду від іонів - заряджених часток. Устаткування для деіонізації є колонками з іонообмінною смолою. Розрізняються деіонізатори роздільної дії (катионо – аніонообмінними) і змішаної дії. Контроль правильності роботи здійснюється виміром питомої електричної провідності води на виході з системи [64].

І останньою стадією очищення води для ін'єкцій залишається дистиляція.

9. Дистиляція. Принцип її роботи не змінився.

3.5. Висновки до розділу

Одним з завдань дипломної роботи було вдосконалити поживне середовище для отримання достатньої кількості живих клітин *P. shermanii*. Пропівоновокислі бактерії є активними продуцентами вітаміна В12, поряд з цим, слід відмітити, що синтез вітаміна залежить від умов культивування.

В натуральних поживних середовищах вміст кобальту складає 0,005 г/л, тому подальше дослідження направлене на вивчення впливу іонів кобальту на вихід біомаси і на синтез вітаміну В12. Внесення в живильне середовище іонів кобальту дещо гальмує біохімічні процеси. Ймовірно, внесення в живильне середовище іонів кобальту збільшує синтез вітаміну В12 і, як наслідок, йде зниження швидкості росту пропіоновокислих бактерій.

Для виробництва імунобіологічних, бактерійних і деяких ін'єкційних препаратів не завжди придатна вода для ін'єкцій, отримана дистиляцією. Тому часто виникає необхідність у доочищенні води і одержанні «особливо чистої води для ін'єкцій», тобто високоочищеної стерильної, апірогенної, вільної від домішок органічних і неорганічних речовин. Її одержують комбінованими методами мембранного розділення на спеціально сконструйованому обладнанні. Вода може використовуватись як всередині фармацевтичного виробництва, так і йти на збут [65].

РОЗДІЛ 4 ОХОРОНА ПРАЦІ

4.1. Небезпечні шкідливі виробничі фактори при отриманні вітаміну B12 (ін'єкційна форма)

Проаналізувавши умови праці при виробництві вітаміну B₁₂ в ампулах можна виділити ряд шкідливих та небезпечних виробничих факторів, які впливають на здоров'я працівників. Відповідно до ГОСТ 12.0.003-74 на працівника в умовах виробництва діють фізичні, хімічні, біологічні, психофізичні.

До фізичних належать підвищений рівень шуму на робочому місці, підвищений рівень вібрації, підвищена або знижена температура поверхонь обладнання, підвищена або знижена вологість повітря та інші [66].

Санітарні норми поширюються на умови мікроклімату в межах робочої зони виробничих приміщень підприємств, закладів, установ тощо, незалежно від їх форми власності та підпорядкування. Для робочої зони виробничих приміщень встановлюються оптимальні та допустимі мікрокліматичні умови з урахуванням важкості виконуваної роботи та періоду року. При одночасному виконанні в робочій зоні робіт різної категорії важкості рівні показників мікроклімату повинні встановлюватись з урахуванням найбільш чисельної групи працівників [67]. Оптимальні умови мікроклімату встановлюються для постійних робочих місць (табл. 4.1).

На виробництві шум створюють таке обладнання: ферментер та посівний апарат, ліофільна сушка, насоси, пакувальне обладнання. Вібрацію спричиняють: сепаратор, ліофільна сушка [67].

Також під час роботи на підприємстві на працівника діяли хімічні небезпечні і шкідливі виробничі фактори. Хімічні речовини (шкідливі та небезпечні), що використовувалися працівником відповідно до ГОСТ 12.0.003-74 за характером впливу на організм людини поділяються на токсичні хімічні небезпечні і шкідливі

виробничі фактори, подразнюючі хімічні небезпечні і шкідливі виробничі фактори [66].

Таблиця 4.1

Оптимальні та допустимі норми мікроклімату у робочих цехах
фармацевтичних підприємств

Виробничі ділянки	Період року			Оптимальні		Допустимі	
		t, °C	W, %	V, м/с	t, °C	W, %	V, м/с
Автоклавувальний відділ	Теплий	20 – 25	60	< 0,3	27	до 75	< 0,4
	Холодний	18 - 21	60	< 0,2	23	до 75	< 0,3
Ферментаційний відділ	Теплий	20 – 25	60	< 0,3	25	до 75	< 0,2
	Холодний	18 - 21	60	< 0,2	20	до 75	< 0,2
Приготування поживного середовища	Теплий	20 – 25	60	< 0,3	26	до 75	< 0,4
	Холодний	18 - 21	60	< 0,2	22	до 75	< 0,3
Сушільний відділ	Теплий	20 – 25	60	< 0,3	24	до 75	< 0,3
	Холодний	18 - 21	40-60	< 0,2	20	до 75	< 0,2
Пакувальний відділ	Теплий	20 – 25	60	< 0,3	24	до 75	< 0,3
	Холодний	18 - 21	40-60	< 0,2	21	до 75	< 0,2

Токсичні хімічні небезпечні і шкідливі виробничі фактори. До цієї групи хімічних факторів належить спирт етиловий, що використовувався для дезінфекції інструментів під час виконання експериментальної частини дипломної роботи. Етиловий спирт належить до 4-го класу небезпеки, а його ГДК у повітрі робочої зони (за ГОСТ 12.1.005-88) становить 1000 мг/м³. До цієї групи відносять також сірководень, що використовувався для визначення типу взаємодії мікроорганізмів з міддю. Сірководень відносять до 3-го класу небезпеки, ГДК у повітрі робочої зони – 10 мг/м³ [66].

Відповідно до ГОСТ 12.0.003-74 небезпечні і шкідливі фактори за своєю дією підрозділяються на наступні групи: фізичні, хімічні, біологічні, психофізичні[66].

На фармацевтичному виробництві можуть впливати такі шкідливі і небезпечні виробничі фактори:

- реактиви, токсичні та хімічні речовини, які входять до складу застосовуваних субстанцій;
- підвищені значення напруги в електричному ланцюзі, замикання якої може пройти через тіло людини;
- підвищена температура повітря в робочій зоні;
- хиткі конструкції, які можуть руйнуватися у процесі виробництва;
- підвищений рівень шуму на робочому місці; підвищений рівень вібрації [67].

4.2. Технічні та організаційні заходи для зменшення рівня впливу небезпечних та шкідливих виробничих факторів при отриманні вітаміну B₁₂ (ін'єкційна форма)

На фармацевтичному виробництві для захисту від шкідливої дії хімічних речовин необхідно дотримуватися регламентованих правил техніки безпеки. З огляду на специфіку виробництва, найбільш значущим чинником, що має негативний вплив на працівників сфери фармацевтичного виробництва вітаміну B₁₂ є підвищена забрудненість повітря в приміщенні. Вказане зумовлене специфікою підготовки та подальшої обробки речовин. Раціональна вентиляція є ефективним захистом працівників від шкідливих речовин у повітрі, вказаною системою необхідно обладнати всі цехи підприємства. Також використовують засоби індивідуального захисту, однак, лише в якості додаткового профілактичного заходу [73].

Встановлення гранично допустимих концентрацій (ГДК) та подальше дотримання визначених норм є одним з основних методів захисту працівників від впливу пилу в виробничих приміщеннях. У разі неможливості дотримання ГДК застосовуються організаційні, медико-профілактичні та технічні заходи й засоби захисту працюючих.

Дотримання наступних заходів з охорони праці, призведе до уникнення шкідливого впливу хімічних речовин на організм працівників, які перебувають у виробничих приміщеннях [72]:

1. проведення обов'язкового інструктажу на кожному робочому місці перед початком роботи;
2. спостереження за повною герметичністю систем та підсистем виробництва;
3. систематичний нагляд за роботою вентиляційних систем;
4. проведення робіт в спеціальному одязі та спеціальному взутті з обов'язковим використанням засобів індивідуального захисту відповідно до класу чистоти кімнати;
5. контроль за дотриманням вимог нормативних документів;
6. нагляд за обладнанням підвищеної небезпеки;
7. всі робочі місця забезпечити необхідною кількістю води та нейтралізуючих речовин.

Також існують організаційні заходи, до яких відносяться:

1. обмеження мінімального віку працюючих (20 років) в умовах, що характеризуються підвищеною запиленістю повітря;
2. введення скороченого робочого дня; додаткові відпустки, більш ранній вихід на пенсію.

Наступна категорія заходів, а саме медико-профілактичних потребує здійснення контролю за станом здоров'я працюючих при вступі й під час роботи. Це виконується шляхом періодичних медичних оглядів [69].

Заборонено використовувати на роботі, пов'язаною з підвищеною запиленістю повітря, персонал з хронічним захворюванням органів дихання, серцево-судинної системи. Медичні огляди повинні проводитися 1 раз у 12 або 24 місяці. Всі роботи з їдкими, отруйними, легкозаймистими й вибухонебезпечними речовинами проводяться в ізольованих і забезпечених належною вентиляцією приміщеннях або у витяжних шафах. Не допускається використання хімічного посуду для харчових цілей та не дозволяється пробувати на смак чи нюхати речовини на підприємстві [69].

Для забезпечення допустимих параметрів шуму передбачено:

- Встановлення перегородок, які можуть ізолювати звук.
- Використання захисних кожухів та екранів.
- Вчасна заміна зношених деталей обладнання, яке може створювати шум.

Найбільш шумні цехи виробництва розташовані в окремих приміщеннях, що відділені від основних виробничих підрозділів стінами, які виготовлені зі звукопоглинаючих матеріалів. Працівники, що працюють в шумних приміщеннях, повинні бути споряджені засобами індивідуального захисту, а саме навушниками, згідно з ГОСТ 12.1.050-86 [69].

Для створення нормальних умов виробничої діяльності необхідно забезпечити не лише комфортні метеорологічні умови, а й необхідну чистоту повітря. Внаслідок виробничої діяльності у повітряне середовище приміщень можуть надходити різноманітні шкідливі речовини, що використовуються в технологічних процесах.

Шкідливі речовини можуть проникати в організм людини через органи дихання, органи травлення, а також шкіру та слизові оболонки. Через дихальні шляхи потрапляють пари, газо - та пилоподібні речовини, через шкіру переважно рідкі речовини. Через шлунково-кишкові шляхи потрапляють речовини під час ковтання або при внесенні їх в рот забрудненими руками [68].

Основним шляхом надходження промислових шкідливих речовин в організм людини є дихальні шляхи. Завдяки величезній (понад 90 м²) всмоктувальній поверхні легенів утворюються сприятливі умови для потрапляння шкідливих речовин у кров.

Шкідливі речовини, що потрапили тим, чи іншим шляхом в організм можуть викликати отруєння (гострі чи хронічні). Ступінь отруєння залежить від токсичності речовини, її кількості, часу дії, шляху проникнення, метеорологічних умов, індивідуальних особливостей організму. Гострі отруєння виникають в результаті одноразової дії великих доз шкідливих речовин (чадний газ, метан, сірководень) [68].

Хронічні отруєння розвиваються внаслідок тривалої дії на людину невеликих концентрацій шкідливих речовин (свинець, ртуть, марганець). Шкідливі речовини, потрапивши в організм, розподіляються в ньому нерівномірно. Найбільша кількість свинцю накопичується в кістках, фтору – в зубах, марганцю – в печінці. Такі речовини

мають властивість утворювати в організмі так зване “депо” і затримуватись в ньому тривалий час [70].

При хронічному отруєнні шкідливі речовини можуть не лише накопичуватись в організмі (матеріальна кумуляція), але й викликати “накопичення” функціональних ефектів (функціональна кумуляція) [68].

Ступінь несприятливого впливу шкідливих речовин, що присутні в повітрі робочої зони, визначається також низкою інших чинників. Наприклад, підвищена температура і вологість, як і значне м'язове напруження, в більшості випадків, підсилюють дію шкідливих речовин [68].

Суттєве значення мають індивідуальні особливості людини. З огляду на це для робітників, які працюють у шкідливих умовах, проводяться обов'язкові попередні (при вступі на роботу) та періодичні (1 раз на 3, 6, 12 та 24 місяці, залежно від токсичності речовин) медичні огляди [68].

Шкідливі речовини, що потрапили в організм людини, спричинюють порушення здоров'я лише в тому випадку, коли їхня кількість в повітрі перевищує граничну для кожної речовини величину. Під гранично допустимою концентрацією (ГДК) шкідливих речовин в повітрі робочої зони розуміють таку концентрацію, яка при щоденній (крім вихідних днів) роботі протягом 8 годин чи іншої тривалості (але не більше 40 годин на тиждень) за час всього трудового стажу не може викликати професійних захворювань або розладів у стані здоров'я, що визначаються сучасними методами як у процесі праці, так і у віддалені строки життя теперішнього і наступних поколінь [68].

За величиною ГДК в повітрі робочої зони шкідливі речовини поділяються на чотири класи небезпеки (ГОСТ 12.1.007-76):

- 1-й – речовини надзвичайно небезпечні, ГДК менше $0,1 \text{ мг/м}^3$ (свинець, ртуть, озон);
- 2-й – речовини високонебезпечні, ГДК $0,1 \dots 1,0 \text{ мг/м}^3$ (кислоти сірчана та соляна, хлор, фенол, їдкі луги);
- 3-й – речовини помірно небезпечні, ГДК $1,1 \dots 10,0 \text{ мг/м}^3$ (вінілацетат, толуол, ксилол, спирт метиловий);

– 4-й – речовини малонебезпечні, ГДК більше 10,0 мг/м³ (аміак, бензин, ацетон, гас) [68].

Гранично допустимі концентрації деяких шкідливих речовин в повітрі робочої зони в таблиці 4.2.

Таблиця 4.2

Гранично допустимі концентрації деяких шкідливих речовин в повітрі робочої зони

Номер	Шкідливі речовини	ГДК, мг/м ³	Клас небезпеки	Агрегатний стан
1	Азоту оксиди	5	2	П
2	Аміак	20	4	П
3	Ангідрид сірчистий	10	3	П
4	Ангідрид сірки	1	2	А
5	Ацетон	200	4	П
6	Бензин-розчинник	300	4	П
7	Бензин-паливний	100	4	П
8	Гас	300	4	П
9	Кислота сірчана	1	2	А
10	Луги їдкі	0,5	2	А
11	Озон	0,1	1	П
12	Ртуть металічна	0,01	1	П
13	Сулема	0,1	1	А
14	Свинець та його неорганічні сполуки	0,01	1	А
15	Окис вуглецю	20	4	П
16	Хлор	1	2	А

Примітки: 1. П – пари; 2. А – аерозоль.

Загальні заходи та засоби попередження забруднення повітряного середовища на виробництві та захисту працюючих включають:

- вилучення шкідливих речовин з технологічних процесів, заміна шкідливих речовин менш шкідливими і т. п. Наприклад, свинцеві білила замінені на цинкові, метиловий спирт – іншими спиртами, органічні розчинники для знежирювання – миючими розчинами на основі води;

- удосконалення технологічних процесів та устаткування (застосовування замкнених технологічних циклів, неперервних технологічних процесів, мокрих способів переробки пиломатеріалів тощо);

- автоматизація і дистанційне управління технологічними процесами та обладнанням, що виключає безпосередній контакт працюючих з шкідливими речовинами;

- герметизація виробничого устаткування, робота технологічного устаткування під розрідженням, локалізація шкідливих виділень за рахунок місцевої вентиляції, аспіраційних укриттів;

- нормальне функціонування систем опалення, загальнообмінної вентиляції, кондиціонування повітря, очистки викидів в атмосферу;

- попередні та періодичні медичні огляди робітників, які працюють у шкідливих умовах, профілактичне харчування, дотримання правил особистої гігієни;

- контроль за вмістом шкідливих речовин у повітрі робочої зони;

- використання засобів індивідуального захисту;

- видалення шкідливих речовин з технологічних процесів, заміна шкідливих речовин менш шкідливими.

Розглянувши технологічну схему виробництва вітаміну В12, а саме приділивши більше часу для детального розгляду її окремих елементів, зокрема тих, що стосуються процесів ферментації (з використанням пропіонової та оцтової кислот та додаванням диметилбензимидазола) та випарювання з подальшою обробкою водним розчином, в т.ч. з задіянням спирту, хлороформу та фенолу, а також процесу екстрагування клітин, при якому досягаються температури до 120° С, можна зробити висновок, що основними чинниками, що можуть негативно впливати на здоров'я працівників, це

загазованість повітря та високі температури на території виробничих потужностей (як приклад виробничий цех).

Отже, для забезпечення необхідних умов для роботи персоналу на виробництві вітаміну В12 без нанесення шкоди здоров'я, необхідно вжити наступні заходи.

Зокрема, на ділянках приготування розчинів передбачаються витяжні шафи. Технологічне обладнання та трубопроводи є джерелом виділення тепла, тому треба, обов'язково, ізоляція. Якість повітря робочої зони потрібно підтримувати у три етапи. На першому етапі запропоновуються - осередкові фільтри типу ФЯВ, на другому - сухі рулонні фільтри типу ФРП, на третьому - осередкові фільтри типу ФЯЛ, ЛАІК, НЕРА [70].

Висока температура повітря робочого цеху, як правило, посилює токсичну дію шкідливих речовин. Головною показником цього ефекту є зміна функціонального стану організму, підвищення терморегуляції, обміну речовин, підвищення тиску. Отже, підвищена температура повітря веде до збільшення інтенсивності потрапляння отрут в організм [70].

На даному підприємстві з виробництва препарату вітаміну В12, головними небезпечними факторами є підвищення температури та завислі в повітрі шкідливі речовини. Тому що, при отриманні інтерферонів застосовується найрізноманітніше технологічне обладнання, яке нагріває повітря. Водопроводи, паропроводи, поверхні ферментерів, сушарок, автоклавів мають високу температуру, яка впливає на повітря робочих зон. А також використовується безліч видів хімічних речовин, суспензій, які забруднюють повітря виробничого цеху. Ці фактори несуть найбільший вплив на здоров'я працівників. Верхня межа показника температури на постійному робочому місці (де працівник проводить більше половини свого робочого часу або не менше 2-х годин поспіль), є температура +28 °С. Для запобігання цього, необхідно надлишкове тепло видаляти за допомогою вентиляції, систематичного провітрювання приміщення, згідно затверджених вимог [70].

Кількість повітря, яка необхідна для видалення надлишкового тепла з виробничого приміщення за формулою (4.1):

(4.1.)

$$Q = \frac{Q_{зб}}{C_n(t_{вид} - t_{пр}) \cdot \rho_{пр}}$$

де $Q_{зб}$ – кількість виділеного надлишкового тепла за годину, ккал/год;

C_n – питома теплоємність повітря, ккал/(кг·°C);

$t_{вид}$ – температура видаленого повітря, °C;

$t_{пр}$ – температура припливного повітря, °C;

$\rho_{пр}$ – густина припливного повітря, кг/м³.

Вихідні дані по виробничому цеху фармацевтичного підприємства:

$Q_{зб} = 44$ ккал/год;

$C_n = 0,25$ ккал/(кг·°C);

$t_{вид} = 32$ °C;

$t_{пр} = 21$ °C;

$\rho_{пр} = 1,206$ кг/м³.

$$Q = \frac{44}{0,25(32 - 21) \cdot 1,206} = 13,27 \text{ м}^3/\text{год}$$

Для видалення надлишкового тепла на виробництві необхідно 13,27 м³/год повітря забезпечуватиме відповідні нормативні показники мікроклімату на фармацевтичному виробництві.

Кількість повітря у виробничому цеху, яка потрібна для зниження концентрації шкідливих речовин, визначається за формулою (4.2):

(4.2.)

$$Q = \frac{G_{із} \cdot 10^6}{C_{гдк} - C_{іпр}}, \text{ м}^3/\text{год},$$

де $C_{гдк}$ – гранично-допустима концентрація шкідливих речовин в повітрі робочого цеху ($C_{гдккац} = 200$ мг/м³);

$G_{із}$ – кількість шкідливих випаровувань в цеху, яку треба зменшувати загальнообмінною вентиляцією, кг/год;

$C_{іпр}$ – концентрація шкідливих парів у припливному повітрі ($G_{апр} = 20$ мг/м³).

$$G_{із} = G_i - G_{ім}, \text{ кг/год},$$

Отже, $G_a = 1,9 \text{ кг/год}$,

$$G_{ім} = Q_m \cdot C_{ім}, \text{ кг/год},$$

$$C_{ам} = 9 \text{ мг/м}^3.$$

Q_m - кількість повітря прокачаного місцевою вентиляцією:

$$Q_m = F \cdot V \cdot 3600, \text{ м}^3/\text{год},$$

де F – площа поперечного перетину отвору місцевої витяжки ($F=15 \text{ м}^2$);

V – швидкість відкачування, ($V=0,6 \text{ м/с}$).

$$Q_m = 32400 \text{ м}^3/\text{год};$$

$$G_{ам} = 0,136 \text{ кг/год};$$

$$G_{із} = 1,9 \text{ (кг/год)} - 0,136 \text{ (кг/год)} = 1,764 \text{ кг/год};$$

$$Q = 1,764 \cdot 10^6 / (200 - 20) = 9800 \text{ м}^3/\text{год}.$$

Отже, щоб знизити концентрацію шкідливих речовин на виробництві при отриманні вітаміну В12, необхідно 9800 м³/год повітря [74].

4.3. Забезпечення пожежної та вибухової безпеки при отримання вітаміну В12 (ін'єкційна форма)

Заходи пожежної та вибухової безпеки – це комплекс технічних і організаційних заходів, направлених на попередження і локалізацію запалень, вибухів, пожеж [72].

Вони встановлені згідно з відповідними стандартами (ГОСТ 12.1.004-91, ГОСТ 12.1.010-76) [72, 73].

Основними причинами пожежі у технологічній лабораторії фармацевтичного підприємства можуть стати: - порушення пожежних норм і правил; - порушення забезпечення первинними засобами пожежогасіння; - несправність електроустаткування і порушення правил їх експлуатації; - перегрівання обладнання; - використання відкритого вогню або паління у заборонених місцях; - погане знання персоналом основ пожежної безпеки; - порушення вимог протипожежного інструктажу під час виконання робіт [72].

Особи, відповідальні за пожежну безпеку, повинні суворо стежити за справністю обладнання, розміщенням засобів пожежогасіння, регулярно роз'яснювати працівникам правила пожежної безпеки і вимагати їх суворого дотримання [72].

Для запобігання пожежі у технологічній лабораторії необхідно: Дотримуватись протипожежних вимог, стандартів, норм, правил, а також виконання вимог приписів і постанов органів державного пожежного нагляду;

Дотримуватись порядку зберігання в приміщенні сировини, напівфабрикатів та готової продукції;

Підтримувати у справному стані системи опалення, вентиляції, обладнання;

Дотримуватись порядку огляду, вимкнення електроустановок, приведення в пожежобезпечний стан приміщень та робочих місць, закриття приміщенні після закінчення роботи;

Утримувати у справному стані засоби протипожежного захисту і зв'язку, пожежну техніку, обладнання та інвентар, не допускати їх використання не за призначенням;

Дотримуватись вимог щодо утримання евакуаційних шляхів та виходів.

Проводити навчання працівників правилам пожежної безпеки та пропаганду заходів щодо їх забезпечення;

Створювати у разі потреби згідно із встановленим порядком підрозділи пожежної охорони та необхідну для їх функціонування матеріально-технічну базу;

Забезпечити споруду та лабораторні кімнати засобами пожежноохоронної сигналізації та пожежогасіння [73].

Усі працівники при прийнятті на роботу і за місцем здійснення професійної діяльності повинні проходити інструктаж з питань пожежної безпеки (вступний, первинний, повторний на робочому місці, позаплановий та цільовий). Посадові особи до початку виконання своїх обов'язків і періодично один раз на 3 роки мають проходити навчання і перевірку знань з питань пожежної безпеки [73].

Припливно-витяжна вентиляція в усіх приміщеннях хімічних лабораторій вмикається за 5 хвилин до початку робочого дня і вимикається після закінчення

роботи. Відповідальний за експлуатацію вентиляційних систем зобов'язаний за графіком перевіряти за допомогою спеціальних приладів ефективність їх функціонування [73].

У разі виявлення пожежі або її ознак (задимлення, запах горіння або тління різних матеріалів тощо), кожен працівник зобов'язаний:

- оцінити обстановку і негайно повідомити про це найближчий пожежнорятувальний підрозділ за тел. 101 (112). При цьому необхідно назвати: адресу об'єкта, вказати кількість поверхів будівлі, місце виникнення пожежі, обстановку на пожежі, наявність людей, а також повідомити своє прізвище;

- вимкнути з мережі прилади електропостачання та систему вентиляції;

- задіяти систему оповіщення людей про пожежу;

- повідомити про виникнення пожежі керівника або особу, що його заміщує і відділ сторожової охорони;

- вжити (по можливості) заходів до евакуації людей та збереження матеріальних цінностей, розпочати гасіння пожежі наявними первинними засобами пожежогасіння;

- організувати зустріч пожежно-рятувальних підрозділів [73].

Також необхідно знеструмити електропроводи і електроприлади, що знаходяться під напругою. Приступити до гасіння пожежі первинними засобами пожежогасіння, а при неможливості здійснення даних дій, вийти з приміщення, щільно зачинити за собою двері. Усі працівники лабораторії зобов'язані вміти користуватися вогнегасниками, іншими первинними засобами пожежогасіння та знати місця їх розташування [72].

РОЗДІЛ 5

ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

Лікарські препарати є невід'ємною складовою медичної практики. Їх застосування забезпечує збереження здоров'я населення і, як наслідок, призводить до підвищення якості та тривалості життя. У той же час відходи фармацевтичної промисловості все в більшій мірі впливають на живу природу, оскільки невикористані ЛЗ нерідко викидаються або утилізуються неналежним чином.

В даний час фармацевтична галузь є однією з найбільших в хімічному виробництві, але зростаюче число медикаментів надає шкоди навколишньому середовищу.

Основними забруднювачами довкілля є:

- фармацевтичні відходи - ліки, що не відповідають медичним нормам і вимогам;
- прострочені лікарські препарати;
- лікарські засоби, що втратили свої споживчі властивості;
- гормональні препарати і антибіотики, які використовуються в тваринництві.

Велика кількість лікарських відходів накопичується в установах охорони здоров'я. Чималу лепту вносять і споживачі лікарських засобів (15% споживачів виливає непотрібні ліки в каналізацію, а в загальному смітті їх викидає близько 75% населення), при цьому не усвідомлюючи небезпеки. Різні дослідження повідомляють про сліди антидепресантів, антибіотиків, наркотичних речовин, гормональних препаратів і багатьох інших в природі (в тому числі в річках, озерах, ставках).

Інфікованість прострочених ліків у багато разів вище в порівнянні зі звичайним побутовим сміттям (багато з них містять потенційно небезпечні мікроорганізми). Зустрічаються відходи, що мають токсичний і радіаційний характер.

Відомо, що з 713 лікарських засобів 631 виявлені в навколишньому середовищі. Сліди близько 20 з них виявлені у питній воді. Це, наприклад, диклофенак, ібупрофен, парацетамол. Антибіотики, потрапляючи в навколишнє середовище, сприяють розвитку стійкості у бактерій. Багато ліків здатні накопичуватися в овочах і рибі.

Фармацевтичні відходи, потрапляючи у водойми, серйозно впливають на водні організми. Вони призводять до порушення харчового ланцюга і, як наслідок, до загибелі багатьох популяцій. Дослідження показують, що риби в річках змінюють сексуальну орієнтацію під впливом гормонів і протизаплідних засобів. Також відбувається порушення комунікацій між підводними організмами, які "спілкуються" за допомогою обміну хімічними речовинами (одні організми їх виділяють, інші вловлюють і реагують).

Деякі ліки схожі з даними речовинами, що призводить до порушення комунікацій.

Основною причиною забруднення води є те, що очисні споруди не здатні видалити всі фармацевтичні речовини. Навіть сучасні методи очищення не дозволяють цього зробити; в стічні води потрапляє близько 10% відходів.

Крім водного середовища забруднення піддається і ґрунт.

Утилізація фармацевтичних відходів здійснюється різними методами, найбільш поширеними з яких є:

- подрібнення в шредерной машині, приведення в нетоварний вигляд з подальшим захороненням на спецполігоні;
- спалювання в печах-інсинератор (термічна обробка) при температурі не нижче 75 градусів;
- стерилізація водяною парою під високим тиском при температурі не нижче 100 градусів;
- хімічна дезінфекція із застосуванням хлорвмісних речовин.

В майбутньому планується повністю спалювати всі медичні відходи, щоб позбутися від необхідності їх поховання на полігонах.

Чи не вирішеним залишається питання з простроченими лікарськими засобами у населення, яке не має можливості їх правильно утилізувати. З цієї причини ліки потрапляють до побутових відходів і ґрунт. рішенням даної проблеми могла б стати встановлення контейнерів для недоброякісних препаратів в спеціальних місцях, таких як поліклініки або аптеки. Подібна практика вже існує в Європі.

5.1. Класифікація фармацевтичних відходів

Класифікація медичних і фармацевтичних відходів дозволяє грамотно здійснити їх утилізацію з мінімальним нанесенням шкоди навколишньому середовищу, а також знизити ризики потрапляння в природу біологічно небезпечних агентів - вірусів і бактерій. Згідно СанПіН 2.1.7.2790-10, відходи медичних установ і фармацевтичних виробництв розділені на п'ять класів залежно від ступеня їх небезпеки.

Відходи класу А. До цього класу відносять відходи, близькі за властивостями і складом до твердих побутових. Це сміття, що не мало контакту з інфекційними реагентами і біологічними рідинами пацієнтів. Сюди входять харчові відходи всіх підрозділів, крім інфекційних, витрачені канцелярське приладдя, що прийшло в непридатність, меблі та інвентар. Цей клас - найзначніший, він становить до 80% усього медичного сміття.

Відходи класу Б. Відносять відходи, які становлять небезпеку в епідеміологічному плані. Це матеріали та інвентар, які зазнали інфікування і потенційно інфіковані. Вони забруднені кров'ю та іншими біологічними рідинами. В цей же клас входять залишки тканин і органів після операцій і патологоанатомічних досліджень, харчові залишки з інфекційних відділень, живі вакцини, відходи лабораторій, фармацевтичних та імунобіологічних підприємств.

Відходи класу В. До цього класу входить надзвичайно небезпечне сміття, яке представляє загрозу для здоров'я населення на прилеглих територіях. Це група, що

включає в себе матеріали, що мали контакт як безпосередньо з хворими на особливо небезпечні інфекції, так і з їх біологічними рідинами. Також сюди входять відходи лабораторій, фармацевтичних та імунобіологічних підприємств, що працюють з мікроорганізмами 1 і 2 груп патогенності. Окремо в цій же категорії, але окремо розподіляють сміття з підрозділів стаціонарів і лабораторій, які працюють зі збудниками туберкульозу.

Відходи класу Г. Це небезпечне сміття, яке представляє собою токсикологічну небезпеку для людей і навколишнього середовища. Включає в себе лікарські, діагностичні та дезінфікуючі засоби, предмети і обладнання, що містять ртуть або інші важкі метали, відходи сировини фармацевтичних виробництв. Вони близькі за складом до промислових і підрозділяються на 4 класу токсичності.

Прострочені лікарські препарати і таблетки, а також складні хімічні сполуки, які використовуються у фармацевтичній промисловості, відносяться до Г класу медичних відходів, тобто є небезпечними для людини і навколишнього середовища, і вони повинні бути утилізовані згідно з нормами і вимогами.

Відходи класу Д. Відносять відходи в будь-якому агрегатному стані, що містять радіонукліди вище гранично допустимих норм безпеки. Збираються в спеціалізовану захисну тару і утилізуються особливими способами.

5.2. Забруднення стічних вод відходами фармацевтичного виробництва

Одним з основних джерел забруднення навколишнього середовища підприємствами фармацевтичного виробництва є потрапляння відходів, що утворюються під час фармацевтичного виробництва до стічних вод підприємства та в подальшому до ґрунтових вод чи систем каналізації населених пунктів.

Тому, критичним аспектом забезпечення охорони навколишнього середовища при фармацевтичному виробництві є ефективний спосіб очищення води від фармацевтичних сполук [84].

5.2.1. Методи очищення води від фармацевтичних сполук

Електрохімічні методи очищення, в останні роки, добре були показані та зарекомендовані в очищенні питної води, стічних вод різного виробництва. Тому, електрохімічні окисдовані процеси вважаються одними з найкращих та найефективніших для видалення стійких органічних забруднювачів, а також фармацевтичних речовин, які мають у своєму включенні анодне окислення, електро-Фентон і фотоелектро-Фентон процеси. В електрохімічних технологіях очищення стічних вод від фармацевтичних речовин можна виділити 2 основні категорії:

- 1) Роздільні, які ізолюють усі забруднювачі із водного середовища без зміни їхньої хімічної структури та складу;
- 2) Деструкційні процеси, які полягають у розщепленні та перетворенні первинних та вторинних молекул забруднювачів у вже побічний продукт [85].

Мембранні технології очищення, такі як нано/ультрафільтрація та зворотний осмос, добре використовуються для видалення важких металів із стічних вод, але для видалення органічних забрудників, особливо лікарських засобів, вони не зовсім підходять, так як із води забирається дуже цінні органічні компоненти, наприклад, рідкі речовини вторинного характеру, які в подальшому можуть бути використані в якості азотного добрива. Методи електрокоагуляції і електрофлотації здебільшого можуть бути використані для безпосереднього очищення стічних вод від органічних речовин, характеризується утворенням достатньої кількості осаду і швидким зношенням електродів, а звичайно великою витратою електроенергії для створення великої щільності струму, так як ефективність очищення при методі електрофлотації безпосередньо залежить від ефективної потужності і споживаної електроенергії.

Якщо говорити про очищення від фармацевтичних сполук, то ця тема дуже важлива у фармацевтичній сфері України. До методів очищення ще також відносять:

1. Окисні процеси. Цей метод застосовується до води, що містить лікарські засоби перед застосуванням біологічної очистки використовується для того, щоб окиснути представлені сполуки у менш токсичні. У якості окисників використовують найчастіше хлор, озон, гіпохлорити, діоксид хлору [85].

2. Адсорбційні процеси. Ці процеси мають а широке використання у фармацевтичній промисловості для видалення органічних домішок.

3. Процес за допомогою озону. Основною характеристикою озону є те, що він є сильним окисником, який може діяти прямим або непрямим шляхом [85].

5.2.2. Технологічна схема очищення фармацевтичних стоків

Технологічна схема очищення фармацевтичних стоків для оборотного використання представлена на (рис. 5.1).

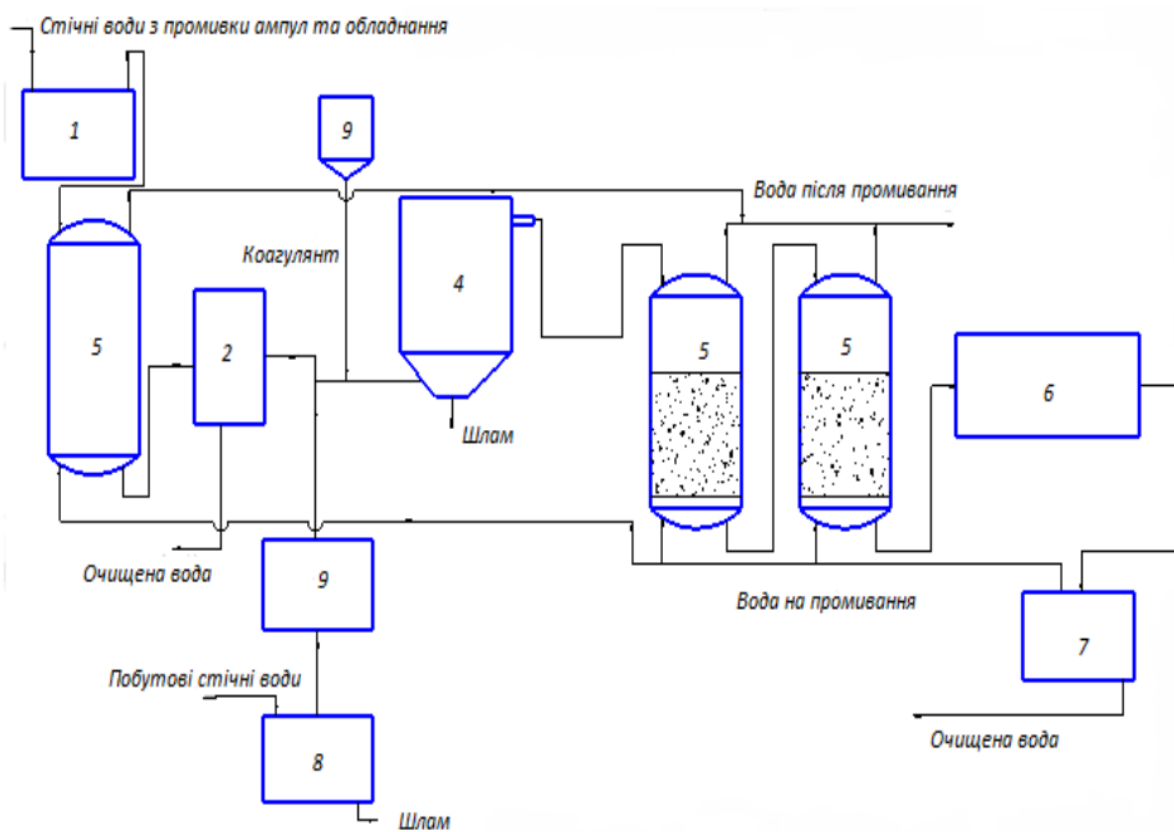


Рис. 5.1. Технологічна схема очищення фармацевтичних стоків для оборотного використання: 1- збірник промислових стічних вод; 2 – нанофільтраційна установка; 3 – проміжний відстійник побутових стічних вод; 4 – освітлювач; 5 – механічні фільтри; 6 – ультрафіолетова фотокаталітична установка; 7 – збірник очищеної води; 8 – відстійник побутових стічних вод; 9 – дозатор коагулянту

Стічні води із усіх житлових районів та води медичних закладів і фармацевтичних підприємств, що скидаються у муніципальні стоки, потрапляють на очисні споруди, де проходять процес біологічної очистки. Але навіть після неї очищені для скиду у природні водойми води містять фармацевтичні препарати та їх компоненти. Це пояснюється тим, що більшість технологічних конструкцій усіх станцій де проводиться біологічна очистка не призначені для видалення із стічних вод невеликої кількості забрудників та мікрозабруднювачів. Забрудненню водних об'єктів фармацевтичними речовинами (зокрема ампулами), виявленню їх присутності, кількості, їхнього складу, способу моніторингу та попередження забруднення і видалення залишків різноманітних фармацевтичних препаратів повинно приділятися дуже велика увага, так як присутність медичних відходів у водних об'єктах згубно впливає на стан води [86].

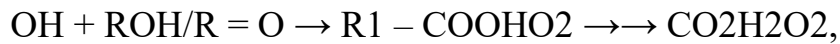
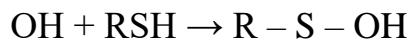
Перевагами даного технологічного процесу є:

- знищує токсичні сполуки та органічні, без переносу забруднень в іншій фазі;
- дуже ефективно для очищення майже всіх органічних забруднювачів;
- використовується для знезараження води;
- невисока вартість;
- адаптація до малих масштабів.

5.3. Метод активного окиснювання для очищення стічних вод при отриманні вітаміну B12

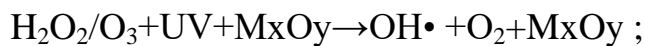
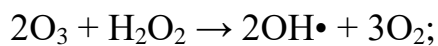
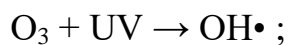
Накопичений в різних країнах досвід з дослідження процесів очищення води від складних органічних забруднень показує, що до найбільш перспективних методів їх очищення від токсичних речовин відноситься хімічна деструкція, яка базується на використанні в якості окиснювача озону, а в якості своєрідного каталізатора УФ – опромінювання. Застосування УФ - опромінювання спільно з озонуванням дозволяє не тільки суттєво знизити необхідну для розкладання органічних речовин кількість озону, але і істотно підвищити глибину їх розкладання. Метою проведених

досліджень була розробка ефективного методу окисної деструкції високотоксичних з'єднань і дезінфекції води, який засновано на застосуванні сумісного впливу озону та інтенсивного ультрафіолетового опромінювання:



де R – органічний компонент [87].

Суть проведених досліджень зводилася до вивчення процесу фотохімічного окислення органічних вуглеводнів, з яких складаються токсичні речовини, озоном O_3 та гідроксильними іонами O^- , OH^- , що утворюються в результаті опромінення штучно приготовленого розчину, який вміщав токсичні відходи, потужним ультрафіолетовим випромінюванням. Основними окиснювачами у проведених дослідженнях виступали гідроксильні радикали і озон, які ефективно реагують з органічними сполуками при дуже високих швидкостях реакцій окислення [87]:



де UV – ультрафіолетове випромінювання; MxOy – каталізатор

Стічні води, які містять токсичні компоненти, за допомогою насосів подавалися у фільтрувальну установку, де відбувалося видалення з них нерозчинених речовин. Далі стічні води надходили до контактної колони, де відбувалося їх змішування з окиснювачем - озоном. В результаті протікання окислювальних реакцій відбувалося первинне руйнування молекулярних ланцюгів органічних вуглеводнів, що значно полегшувало процес їх подальшого руйнування у блоці фотохімічного окислення.

Після контактної колони стічні води надходили до фотохімічного реактора, де піддавалися опроміненню потужним ультрафіолетовим випромінюванням. Ефективність фотохімічних реакцій істотно зростала при введенні в зону реакції спеціальних каталізаторів (заліза та двоокису титану) і озону. Після фотохімічного

реактора стічні води поступали до відстійника, де проходило видалення з води нерозчинених продуктів [87].

В результаті такої обробки відбувалося майже повне знешкодження та знезараження стічних вод з одночасним отриманням продуктів наступних класів безпеки: тверда фаза - 3 - 4 клас небезпеки; рідинна фаза – нетоксична технічна вода. Апробація цього методу знешкодження токсичних вод проводилася на експериментальній установці. В якості модельного розчину використовувалася водопровідна вода, до якої були додані забруднювачі та отрутохімікати (карбофос, ампіцилін, прометрин та рагор). Початкова концентрація токсичних речовин у воді складала 20 - 45 мг/дм³. Також проводилося порівняння ефективності вибраного методу знешкодження токсичних стоків з методами їх окремого озонування та УФ опромінювання [87].

Результати проведених експериментів відображені у таблицях 5.1 – 5.3.

Таблиця 5.1

Обробка стічних вод за допомогою тільки УФ опромінювання

№	Параметр	Забруднююча токсична речовина			
		Карбофос	Ампіцилін	Прометрин	Рагор
1	Початкова концентрація, мг/дм ³	31,5	20,7	45,2	40,3
2	Кінцева концентрація, мг/дм ³	15,1	9,7	22,9	18,5
3	Концентрація озону, мгО ₃ /дм ³	-	-	-	-
4	Доза УФ опромінення, Дж/см ³	1,5	1,5	1,5	1,5
5	Температура рідини, °С	18	18	20	19
6	Ступінь очищення, %	52,1	53,2	49,4	54,0

Дослідна установка складалася з контактної колони, до якої приєднаний УФ реактор, циркуляційного насоса та генератора озону. Потужність УФ реактора становила 60 Вт. Продуктивність генератора озону складала 4 гО₃/годину. Концентрація озону вимірювалася за допомогою газоаналізатора ОЗОН. Для

вимірювання дози УФ опромінення використовувався УФ дозиметр ДАУ-21. Час обробки модельного розчину становив 30 хвилин. Кількість токсичної рідини у системі складала 50 дм³ [87].

Таблиця 5.2

Обробка стічних вод за допомогою озону

№	Параметр	Забруднююча токсична речовина			
		Карбофос	Ампіцилін	Прометрин	Рарог
1	Початкова концентрація, мг/дм ³	32	21,0	44,5	39,2
2	Кінцева концентрація, мг/дм ³	10,5	7,3	16,0	13,0
3	Концентрація озону, мгО ₃ /дм ³	4,0	4,0	4,1	4,0
4	Доза УФ опромінення, Дж/см ³	-	-	-	-
5	Температура рідини, °С	20	21	20	20
6	Ступінь очищення, %	67,2	65,2	64,0	66,8

Таблиця 5.3

Обробка стічних вод при комплексній дії УФ опромінювання та озону

№	Параметр	Забруднююча токсична речовина			
		Карбофос	Ампіцилін	Прометрин	Рарог
1	Початкова концентрація, мг/дм ³	30,8	20,9	45,4	40,2
2	Кінцева концентрація, мг/дм ³	0,86	0,42	0,68	1,0
3	Концентрація озону, мгО ₃ /дм ³	4,0	3,9	4,1	4,0
4	Доза УФ опромінення, Дж/см ³	1,5	1,5	1,5	1,5
5	Температура рідини, °С	18	18	20	19
6	Ступінь очищення, %	97,2	97,8	98,5	97,5

Концентрація інших забруднюючих речовин не вимірювалася. Проведені дослідження показали, що спільне використання ультрафіолетового опромінювання

разом з озонуванням забезпечує зниження рівня забруднення стічних вод токсичними речовинами з ефективністю більше 97% (рис. 5.2). Це дозволяє розглядати цей метод у якості ефективного засобу очищення стічних вод від токсичних органічних речовин [87].

Як видно з отриманих результатів окремо УФ опромінювання та озонування забезпечують знешкодження токсичних речовин відповідно у 49,4 – 54,0% та 64,0 – 67,2%, що не забезпечує достатньої ефективності. Однак при сумісному застосуванні УФ опромінення та озонування ефективність знешкодження токсичних речовин різко збільшується і перевищує 97% [87].

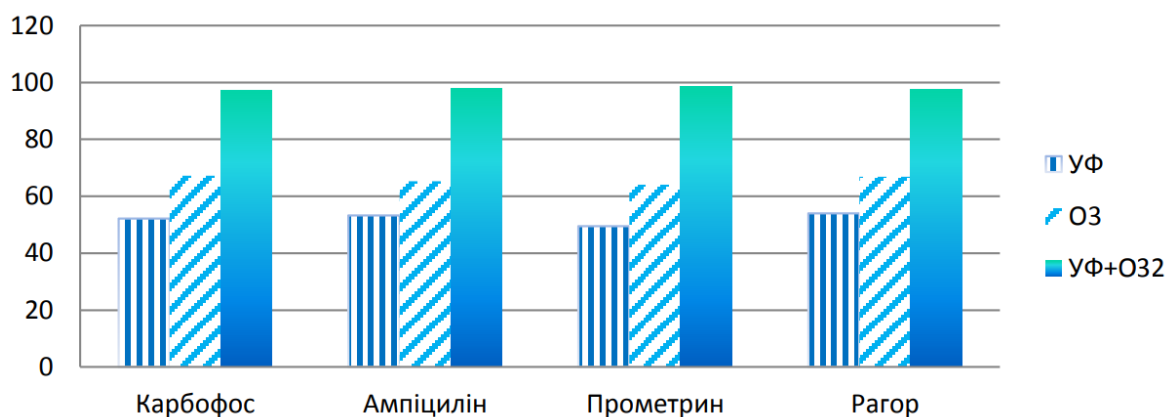


Рис. 5.2. Ефективність знешкодження токсичних речовин в стічних водах різними методами

5.4. Висновки до розділу

Отже, одним з основних джерел забруднення навколишнього середовища підприємствами фармацевтичного виробництва є потрапляння відходів, що утворюються під час фармацевтичного виробництва до стічних вод підприємства та в подальшому до ґрунтових вод чи систем каналізації населених пунктів. Тому, критичним аспектом забезпечення охорони навколишнього середовища при фармацевтичному виробництві є запровадження ефективного способу очищення води від фармацевтичних сполук. Метод активного окиснювання можна рекомендувати для не тільки для фармацевтичних підприємств, а й для знешкодження токсичних

стоків звалищ побутових та промислових відходів, очищення стічних вод, утилізації застарілих пестицидів та мінеральних добрив, що прийшли в непридатність, знешкодження непридатних лікарських препаратів, тощо. А також для вирішення глобальних проблем охорони навколишнього середовища та ліквідації антропогенних технологічних факторів.

ВИСНОВКИ

1. Показано, що внесення в поживне середовище 0,003 г/л кобальту підвищило кількість життєздатних клітин пропіоновокислих бактерій на 10%.
2. Доведено, позитивна дія кобальту (0,003 г/л) підвищила вміст вітаміну В12 в поживному середовищі на 19 мкг/мл у порівнянні з контролем.
3. Удосконалена технологічна схема отримання води для ін'єкції, суть якої полягає в тому, що окрім процесу дистиляції води, її додатково доочищують комбінованими методами мембранного розділення на спеціально сконструйованому обладнанні.

СПИСОК БІБЛЮГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ребров В. Г. Витамины, макро- и микроэлементы. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 128 с.
2. Забарило, Т. Жиророзчинні вітаміни / Тетяна Забарило // Здоров'я та фіз.культура. Шк. світ : газ. для вчителів фізкультури та основ здоров'я, методистів, тренерів : інформ.-метод. вид. – 2012. – N 19. – С. 30.
3. Збаражська, І. Р. Особистісно орієнтований урок з теми "Вітаміни, їх значення, способи збереження" / І. Р. Збаражська // Біологія : наук.-метод. журн. – 2010. – N 4. - С. 15-17.
4. Данилова И.В., Доронина Н.В., Троценко Ю.А., Нетрусов А.И., Рыжикова И.П. Участие витамина В12 в биосинтезе ДНК у *Methylobacterium dichloromethanicum*, зависимое от интенсивности аэрации // Микробиология. 2004. № 2. С. 169–174.
5. Спиричев В.Б. Теоритические и практические аспекты современной витаминологии / В.Б. Спиричев // Украинский биохимический журнал. – 2004. – Т. 76, № 4. – С. 32 – 49.
6. Перекатова Т.Н., Остроумова М.Н.. Еще раз о дефиците витамина В12 // Клиническая онкогематология. 2009. Т. 2. № 1. С. 185–195
7. [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://www.studmed.ru/view/kursovaaya-rabota-opredelenie-vitamina-v12-v-biologicheskikh-obektah_aa00005cac8.html?page=1.
8. Луцкий И.С., Лютикова Л.В., Луцкий Е.И. Витамины группы В в неврологической практике // Международный неврологический журнал. 2008. № 2. С. 89–93.
9. Андрианова М.Ю., Ройтман Е.В., Исаева А.М., Колесникова И.М., Нуреев М.В. Патогенетическое и клиническое обоснование комплексной профилактики гипергомоцистеинемии // Архив внутренней медицины. 2014. № 4(18). С. 32–36.

10. Заика С.Н., Жилкова Н.Н., Сейидов В.Г. Особенности гемодинамики печени при витамин-В12- дефицитной анемии // Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2012. № 1–2. С. 47–48.
11. Навменова Я.М., Мохорт Т.В. Содержание витамина В12 и гомоцистеина у пациентов с сахарным диабетом 1-го типа и депрессией // Здоровоохранение. 2012. № 11. С. 18–20.
12. Машковский М.Д. Лекарственные средства. В2 ч. – Минск: Беларусь, 1987. 576 с.
13. Старчина Ю.А.. Витамины группы В в лечении заболеваний нервной системы // Неврология, нейропсихиатрия, психоматика. 2009. № 2. С. 84–87.
14. Патент 2180001 РФ. Штамм бактерий *Pseudomonas fluorescens* ВКМ В-2224Д – продуцент витамина В12 / А.И. Пахтуев, Ф.Н. Чегодаев; Бердский завод биологических препаратов. – №2000103571; Заяв. 15.02.2000; Оpubл. 27.02.2002; Бюл. № 13.
15. Патент 1737915 РФ. Штамм бактерий *Propionibacterium shermanii* – продуцент витамина В12 / Т.В. Ганичева, В.Д. Грузина, Г.М. Пароникян и др.; Курганский комбинат медицинских препаратов и изделий «Синтез». – №4806695; Заяв. 26.03.1990; Оpubл. 30.11.1994; Бюл. № 13.
16. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підручник. — К.: НУХТ, 2004. — 471 с.
17. Сейдаметова Э.А., Шакирзянова М.Р., Рузиева Д.М., Гулямова Т.Г.
18. Получение кобальтоустойчивых штаммов пропионовокислых бактерий – активных продуцентов витамина В12 // Прикладная биохимия и микробиология. 2004. № 6. С. 645–648.
19. Гора О.Н., Павлов И.Н.. Исследование некоторых основных факторов, определяющих получение сухих препаратов пропионовокислых бактерий // Техника и технология пищевых производств. 2011. № 4. С. 78–81.
20. Официальный сайт завода препаратов микробиологического синтеза «Энзим». [Электронный ресурс] – Режим доступа до ресурсу: <http://enzim.biz/>
21. Шершенков Б.С., Сучкова Е.П.. Ультразвуковая модуляция метаболической активности *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* при получении пищевых

продуктов, обогащённых витамином В12 // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия «Процессы и аппараты пищевых производств». 2013. № 2. [Электронный ресурс] – Режим доступа до ресурсу: <http://www.processes.ihbt.ifmo.ru> 22. Тимощенко Л.В., Чубик М.В., Пестряков А.Н.. Основы микробиологии и биотехнологии. – Томск: Томский политехнический университет, 2011. 194.

22. Буценко Л.М., Пенчук Ю.М., Пирог Т.П. Технології мікробного синтезу лікарських засобів: Навч. посіб. — К.: НУХТ, 2010. — 323 с.

23. Пробиотики для здоровья. Микробиологический синтез витамина В12. [Электронный ресурс] – Режим доступа до ресурсу: <http://propionix.ru/mikrobiologicheskiy-sintez-vitamina-b12>

24. Zhou S., Ashok S., Ko Y., Kim D.-M, Park S. Development of a deletion mutant of *Pseudomonas denitrificans* that does not degrade 3-hydroxypropionic acid // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014. V. 98. Issue 10. P. 4389–4398.

25. Cheng X., Chen W., Peng W.-F., Li K.-T.. Improved vitamin B12 fermentation process by adding rotenone to regulate the metabolism of *Pseudomonas denitrificans* // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2014. V. 173. Issue 3. P. 673–681.

26. Arasu M.V., Sarkar R. et al. Isolation of a novel *Pseudomonas* species SP2 producing vitamin B12 under anaerobic condition // *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2013. V. 18. Issue 1. P. 43–51.

27. Коденцова В. Витамины: функции, витаминный дефицит, пути его ликвидации. // *Врач*. – 2007. – № 9. – с. 14-20.

28. Боечко Ф.Ф., Боечко Л.О. Основні біохімічні поняття, визначення і терміни. — К., 1993;

29. Вороніна Л.М., Десенко В.Ф., Мадієвська Н.М. та ін. Біологічна хімія. — Х., 2000;

30. Губський Ю.І. Біологічна хімія. — К.–Тернопіль, 2000;

31. Ковальов В.М., Павлій О.І., Ісакова Т.І. Фармакогнозія з основами біохімії рослин. — Х., 2000;

32. Машковский М.Д. Лекарственные средства. В 2 т. — Х., 1997.

33. Широбоков В. П., Янковський Д. С., Димент Г. С. Нові стратегії в області створення і клінічного використання пробіотиків // Вісн. фармакології та фармацевції. 2010. № 2. С. 18–30.
- 34.
35. Горбачев В.В., Горбачева В.Н. Витамины, микро- и макроэлементы. Минск: Книж. дом, 2002. 544 с.
36. Боечко, Любов Олександрівна. Основи біохімії вітамінів і гормонів: навч. осіб. / Л.О. Боечко. – Черкаси : Б.В., 2005. – 294 с. – Бібліогр.: с. 278.
37. Громова О.А., Торшин И.Ю., Прокопович О.А. Синергидные нейропротекторные эффекты тиамин, пиридоксин и цианокобаламина в рамках протеома человека Неврология и ревматология. 2016; с: 76–84.
38. Wilkins M. Proteomics data mining *Exp. Rev. Proteom.* 2009; P. 599–603.
39. Torshin I. Yu. Sensing the change from molecular genetics to personalized medicine Nova Biomedical Books. NY, USA, 2009.
40. Бышевский А.Ш., Волосатов А.А., Карпова И.А. и др. Витамин В12 и гемостаз *Фундамент. исслед.* 2013; P. 221–226.
41. Markle H.V. Cobalamin *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 1996; 33 (4): 247–356.
42. Savage D.G., Lindenbaum J. Neurological complications of acquired cobalamin deficiency: clinical aspects *Bailliere's Clin. Haematol.* 1995; P. 657–678.
43. Капрельянц Л. В., Труфкаті Л. В., Крупицька Л. О. Усовершенствование остава питательной среды для культивирования бифидобактерий // *Наук. вісн. ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького.* 2015. Т. 3. № 4 (64). С. 47–54.
45. Моррисон В.В., Чеснокова Н.П., Невважай Т.А. и др. зэритропоетические анемии. Этиология и патогенез В12-дефицитной анемии *Международ. журн. прикл. и фундамент. исслед.* 2015; С. 159–162.
46. Хамагаева И.С.. Биотехнология заквасок пропионовокислых. – М.: ВСГТУ, 2006. 172 с.
47. Мельничук М.Д., Кляченко О.Л., Бородай В.В., Коломієць Ю.В. Загальна (промислова) біотехнологія: навчальний посібник/ – Київ: ФОП Корзун Д.Ю., 2014. - 252 с.

48. Дмитрієвського Д. І. Технологія лікарських препаратів промислового виробництва. - Вінниця: НОВА КНИГА, 2008. - 280 с.

49. Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации: метод. рекомендации МР 2.3.1.2432-08. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. 38 с.

50. Elia M. Oral or parenteral therapy for B12 deficiency *Lancet*. 1998; P. 1721–1725.

51. Драпкина О.М., Шепель Р.Н. Связь между дефицитом витамина В12, риском развития сердечно-сосудистых заболеваний и процессами старения. Рац. фармакотерапия в кардиол. 2017; P. 100–106.

52. Nexo E., Hoffmann-Lucke E. Holotranscobalamin. a marker of vitamin B12 status: analytical aspects and clinical utility *Am. J. Clin. Nutr.* 2011; P.359–365.

53. Nexo E., Hvas A.-M., Bleie O. et al. Holo-transcobalamin is an early marker of changes in cobalamin homeostasis. A randomized placebocontrolled study */Clin. Chem.* 2002; P. 1768–1771.

54. Clarke R. et al. Screening for vitamin B12 and folate deficiency in older persons *Am. J. Clin. Nutr.* 2003; P. 1241–1247.

55. Andres E., Affenberger S., Vinzio S. et al. Food-cobalamin malabsorption in elderly patients: clinical manifestations and treatment *Am. J. Med.* 2005; P. 1154–1159.

56. Спиричев В.Б. Обогащение пищевых продуктов витаминами и минеральными веществами / В.Б. Спиричев, Л.Н. Шатнюк, В.М. Позднянский // Новосибирск: Сиб. универс. издание, 2004. — 547 с.

57. Finch S., Doyle W., Lowe C. et al. National Diet and Nutrition Survey: people aged 65 years and over Volume 1: Report of the diet and nutrition survey. London: TSO; 1998.

58. Carmel R., Perez-Oerez G., Blaser M. Helicobacter pylori infection and food-cobalamin malabsorption *Dig. Dis. Sci.* 1994; P. 309–314.

59. Fried M., Siegrist H., Frei R. et al. Duodenal bacterial overgrowth during treatment in outpatients with omeprazole *Gut*. 1994; P. 23–26.

60. Lam J.R., Schneider J.L., Zhao W. et al. Proton pump inhibitor and histamine 2 receptor antagonist use and vitamin B12 deficiency JAMA. 2013; 310 P. 2435–2442.

61. Hughes C.F., Ward M., Hoey L. et al. Vitamin B12 and ageing: current issues and interaction with folate Ann. Clin. Biochem. 2012; P. 315–329.

62. Norberg B. Turn of tide for oral vitamin B12 treatment // J. Intern. Med. 1999; P. 237–238.

63. Nyholm E., Turpin P., Swain D. et al. C. Oral vitamin B12 can change our practice Postgrad. Med. J. 2003; P. 218–219.

64. Киричек Л.Т. Фармакология вітамінів / Л.Т. Киричек //Международ. мед. журн. — 2005. — Т.7, №4. — С.97–104.

65. Поводзинський В. М., Шибецький В. Ю. Устаткування асептичних і неасептичних виробництв лікарських засобів./ -К: КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2017, с. 251.

66. ГОСТ 12.0.003-74. Система стандартів безпеки праці. Опасные и вредные производственные факторы. Классификация.

67. Постанова № 42 від 01.12.99 - Санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень ДСН 3.3.6.042-99.

68. Безпека життєдіяльності в системі «Людина-Виробниче середовище». [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://web.posibnyky.vntu.edu.ua/fmbt/berezyuk_bezpeka_zhittyediyalnosti/41.htm

69.ГОСТ 12.1.050-86. Система стандартів безпеки праці. Общие требования.

70.ГОСТ 12.1.012-90. Система стандартів безпеки праці. Вибрационная безопасность. Общие требования.

71 .ДСН 3.3.6.039-99. Державні санітарні норми виробничої загальної та локальної вібрації.

72. Желібо Є. П. Безпека життєдіяльності: [навч. посібник] / Є. П. Желібо, Н. М. Заверуха, В. В. Зацарний. – 4-те вид. – К.: Каравела, 2005. – 344с.

73. ГОСТ 12.1.004-91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования. – Введ. 1992-07-01. – М. : Стандартинформ, 2006. – 95 с.

74. Облаштування і розрахунок системи загальнообмінної вентиляції виробничих приміщень. [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://studfile.net/preview/5204035/>

75. Дорохович А.М. Оптимізації технологічних процесів галузі (кондитерське виробництво): конспект лекцій для студ. спец. 7.091702 «Технологія хліба, кондитерських, макаронних виробів та харчоконцентратів» / А.М. Дорохович, В.І. Оболкіна, О.О. Гавва. – К.: НУХТ, 2009. – 89 с.

76. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: підручник / Пирог Т.П. — К.: НУХТ, 2004. — 471 с.

77. ГОСТ 12.0.003-74. Система стандартов безопасности труда. Опасные и вредные производственные факторы. Классификация.

78. Постанова № 42 від 01.12.99 - Санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень ДСН 3.3.6.042-99. ГНД 01.001.98. GMP. Належна виробнича практика GMP. — К.: Держкоммедбіопром, 1998. — 126 с.

79. Буценко Л.М., Пирог Т.П., Пенчук Ю.М. Технології мікробного синтезу лікарських засобів. – К.: НУХТ, 2010. – 323 с.

80. Вовк О. О., Бойченко М. С. причинно-наслідковий аналіз стану навколишнього стану екологічної безпеки під час виробництва та використання фармацевтичної продукції. // Наукоємні технології № 1 (33). 2017. – 7 с.

81. Посилкіна О. В. Впровадження логістичних підходів в управлінні відходами у фармацевтичній галузі / О. В. Посилкіна, Р. В. Сагайдак // Проблемы подготовки профессиональных кадров по логистике в условиях глобальной конкурентной среды. Сб. докладов IV Международной научно-практической конференции. – К., 2006. – С. 67 – 68.

82. Сагайдак Р. В. Актуальність впровадження реверсивної логістики в умовах фармацевтичної галузі / Р. В. Сагайдак // Український вісник психоневрології. – Т. 14. – Вип. 2 (47). – Додаток. – 2006. – С.194 – 195.

83. Посилкіна О. В. Фармацевтична логістика: Монографія / О. В. Посилкіна, Р. В. Сагайдак, Б. П. Громовік. – Х.: Вид-во НФаУ, Золоті сторінки, 2004. – 320с.

84. ГОСТ 12.1.007-76 Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности. – М. : Госиздат, 1976. – 32 с.

85. ГОСТ 17.4.2.01-81 Охрана природы. Почвы. Номенклатура показателей санитарного состояния. – М. : Госиздат, 1981. – 44 с.

86. [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу:
<https://nuczu.edu.ua/images/topmenu/science/vseukrainskij-konkurs-studencheskikh-nauchnikh-rabot-s-oblastej-znanij-i-spetsial-nostej/cz/7.pdf>

87. Шаляпін С.М., Штонда Ю.І. Фотохімічний метод очищення стічних вод від токсичних речовин // Науково-практичний журнал «Водопостачання, водовідведення» №3, 2016, С. 61- 64.

Технологічна схема отримання вітаміну В12

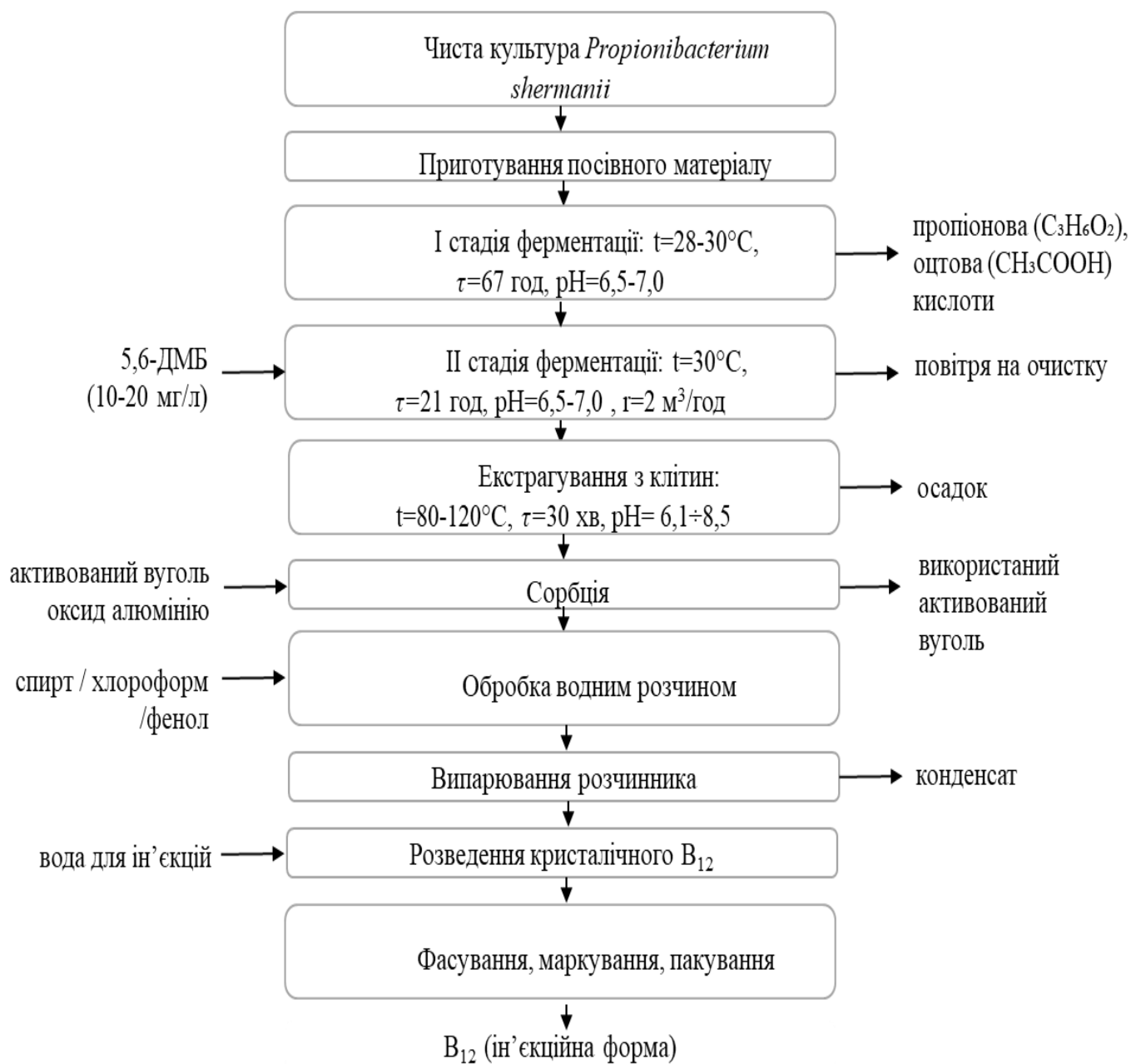
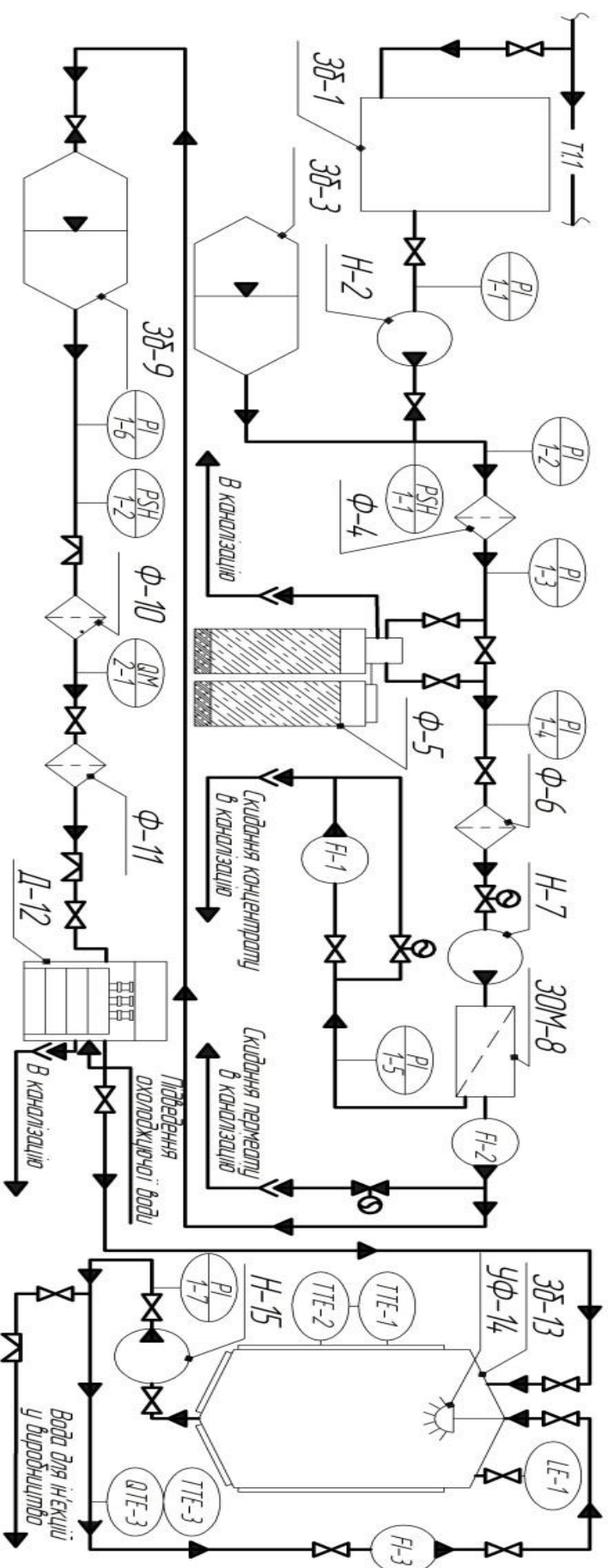
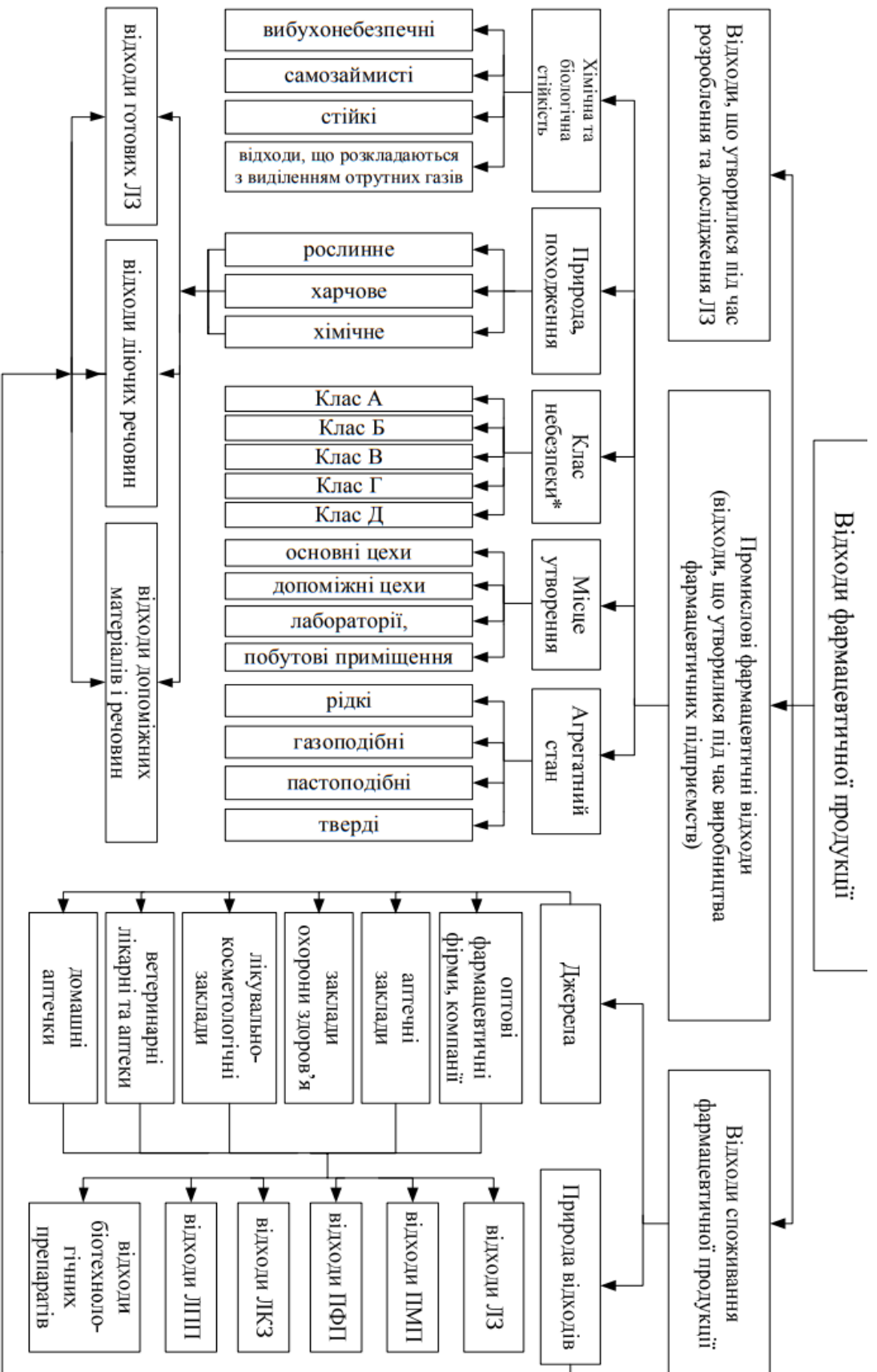


Схема процесу отримання води фармакопейної якості



ЗБ-1 збірник, Н-2 насос постійного тиску і продуктивності, ЗБ-3 збірник гідроакмулюючий, Ф-4 фільтр дисковий, Ф-5 фільтр-пом'якшувач двокорпусний іонообмінний модуль, Ф-6 фільтр змішаної дії, Н-7 насос постійного тиску та продуктивності для подачі води на зворотньоосмотичний модуль, ЗМ-8 система зворотнього осмосу, ЗБ-9 збірник води очищеної, Ф-10 фільтр змішаної дії, Ф-11 фільтр фінішний, Д-12 багатокорпусна дистляційна установка, ЗБ-13 збірник накопичення і зберігання води для ін'єкцій, УФ-14 ультрафіолетовий випромінювач, Н-15 насос циркуляційний. Позначення приладів контролю: ФІ – ротаметр, РІ – манометр, ҚМ – кондукто-метр, LE – датчик безперервного рівня води в збірнику, ТТЕ – термометр-рівняч, QTE – модуль вимірювальня питомої електропровідності і температури води.

Узагальнена систематизація фармацевтичних відходів



* Клас А — епідеміологічно безпечні; Клас Б — епідеміологічно небезпечні; Клас В — надзвичайно епідеміологічно небезпечні; Клас Г — радіоактивні; Клас Д — токсикологічно небезпечні; Клас Е — радіоактивні.