

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

До захисту допускається

Завідувач кафедри

Владислав КОВАЛЕНКО

" ____ " _____ р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

за першим (бакалаврським) рівнем вищої освіти

на тему: «Одержання гіалуронової кислоти»

Виконав (-ла):

Вячеслав ЛИСЕНКО

Ім'я ПРІЗВИЩЕ

Група:

БІО 2101

Науковий керівник

Володимир ДУБОВИК

Ім'я ПРІЗВИЩЕ

Рецензент

Вікторія СКЛЯР

Ім'я ПРІЗВИЩЕ

СУМИ -2025

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
СУМСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет *агротехнологій та природокористування*

Кафедра *біотехнології та хімії*

Ступень вищої освіти – *бакалавр*

Спеціальність – *162 «біотехнології та біоінженерія»*

ЗАТВЕРДЖУЮ:

Завідувач кафедри

Владислав КОВАЛЕНКО

« ____ » _____ 202_ р.

ЗАВДАННЯ
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ

Студенту **Лисенку Вячеславу Миколайовичу**

Тема роботи: **Одержання гіалуронової кислоти**

1. Керівник бакалаврської роботи Дубовик Володимир Іванович, к. с.-г. н., доцент

2. Строк подання здобувачем закінченої роботи _____

3. Вихідні дані до кваліфікаційної роботи – _____

4. Зміст к розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які необхідно опрацювати) _____

5. Перелік графічного матеріалу (з точною вказівкою обов'язкових креслень) _____

Керівник кваліфікаційної роботи _____ / Володимир ДУБОВИК

Завдання прийняв до виконання _____ / Вячеслав ЛИСЕНКО

Дата отримання завдання « ____ » _____ 20_ р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ п/п	Назви етапів кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітки
1.	Вибір теми і об'єкта досліджень	5-й семестр	
2.	Розробка завдання до кваліфікаційної роботи; складання календарного плану; формування змісту розрахунково-пояснювальної записки (формування переліку питань, які необхідно опрацювати в роботі). Підбір методик для проведення досліджень	5-й семестр	
3.	Виконання кваліфікаційної роботи	8-й семестр	
3.1.	Підбір та аналіз літературних джерел з теми кваліфікаційної роботи	5-й семестр	
3.2.	Збір вихідних даних (проведення польових досліджень) для написання експериментальної частини кваліфікаційної роботи	6-й семестр	
3.3.	Підготовка загального варіанту кваліфікаційної роботи (розділ 1-3, висновки)	7-й семестр	
3.4.	Апробація результатів дослідження	За 40 днів до дати захисту	
4.	Перевірка роботи науковим керівником і допуск до попереднього захисту	За 35 днів до дати захисту	
5.	Перевірка кваліфікаційної роботи на унікальність	За 30 днів до захисту	
6.	Рецензування	За 15 днів до захисту	
7.	Попередній захист кваліфікаційної роботи	За 10 днів до захисту	
8.	Прилюдний захист кваліфікаційної роботи перед екзаменаційною комісією	Відповідно наказу ректора	

Керівник кваліфікаційної роботи _____ / Володимир ДУБОВИК

Здобувач _____ / Вячеслав ЛИСЕНКО

АНОТАЦІЯ

Лисенко Вячеслав Миколайович

ОДЕРЖАННЯ ГІАЛУРОНОВОЇ КИСЛОТИ

162 Біотехнології та біоінженерія

СУМСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Суми – 2025

Кваліфікаційна робота присвячена розробці технологічної та апаратурної схем виробництва гіалуронової кислоти за допомогою бактеріального штаму *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. Даний бактеріальний штам синтезується при рості на субстраті із сахарози з додаванням гідролізату казеїну, дріжджового екстракту та солей.

Гіалуронова кислота - це природний полімер, присутній у всьому тілі, що має високі зволожуючі і ремоделюючі властивості. У найбільшій концентрації міститься в рідині ока і суглобах. Виділяється із хрящових тканин тварин або синтезується біотехнологічним способом за участі мікроорганізмів.

Розрахована річна потужність виробництва згідно статистики людей по Україні, які мають потребу в гіалуроновій кислоті в ролі замітника синовіальної рідини для лікування хвороби остеоартрозу.

Технологічний процес складається з допоміжних стадій та основних робіт. У фіналі технологічний процес закінчується післяферментаційними роботами. Останнє це фасування, пакування, маркування та відвантаження.

Кваліфікаційна робота містить 61 сторінок друкованого тексту, 6 таблиць, 6 рисунків і складається з вступу, трьох розділів, списку використаної літератури (44 джерел) та додатки.

Ключові слова: гіалуронова кислота, біосинтез, культивування, ферментація.

ABSTRACT

Lysenko Vyacheslav Mykolayovych

OBTAINING HYALURONIC ACID

162 Biotechnology and bioengineering

SUMY NATIONAL AGRARIAN UNIVERSITY

Sumy - 2025

The qualification work is devoted to the development of technological and hardware schemes for the production of hyaluronic acid using the bacterial strain *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. This bacterial strain is synthesised by growing on a sucrose substrate with the addition of casein hydrolysate, yeast extract and salts.

Hyaluronic acid is a natural polymer present throughout the body that has high moisturising and remodelling properties. It is found in the highest concentration in eye fluids and joints. It is extracted from animal cartilage tissues or synthesised by biotechnology using microorganisms.

The annual production capacity was calculated based on the statistics of people in Ukraine who need hyaluronic acid as a synovial fluid substitute for the treatment of osteoarthritis.

The technological process consists of auxiliary stages and main operations. Finally, the technological process ends with post-fermentation work. The latter includes packing, labelling and shipping.

The qualification work contains 61 pages of printed text, 6 tables, 6 figures and consists of an introduction, three chapters, a list of references (44 sources).

Keywords: hyaluronic acid, biosynthesis, cultivation, fermentation.

ЗМІСТ

ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ГІАЛУРОНОВОЇ КИСЛОТИ (Огляд літератури)	9
РОЗДІЛ 2. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОАГЕНТА	14
2.1. Біоагент та поживне середовище	14
2.2. Розрахунок необхідної кількості компонентів для поживного середовища	17
2.3. Морфолого-культуральні характеристики	19
РОЗДІЛ 3. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА ГІАЛУРОНОВОЇ КИСЛОТИ	20
3.1. Потреба у гіалуронової кислоти	20
3.2. Біосинтез гіалуронової кислоти	27
3.3. Обрання технологічної схеми	31
3.4. Підбір технологічного обладнання для післяферментаційних етапів із врахуванням матеріальних потоків за стадіями.	42
3.5. Контроль виробничого процесу	42
ВИСНОВКИ ТА ПРОПОЗИЦІЇ	43
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	44
ДОДАТКИ	49

ВСТУП

Гіалуронова кислота (ГК) є лінійним глікозаміногліканом, що складається з 2000–25000 дисахаридів, утворених із молекул глюкоуронової кислоти та N-ацетилглюкозаміну, з'єднаних β -(1-3) та β -(1-4) глікозидними зв'язками. Завдяки своїм в'язкопружним властивостям і нетоксичності, ГК знайшла широке застосування у різних сферах: зволоження шкіри в косметології, фармацевтичне виробництво препаратів для лікування остеоартриту, офтальмологічна хірургія, профілактика післяопераційних спайок та загоєння ран [1].

Молекулярна маса ГК варіюється залежно від джерела отримання та може складати від 5000 до 20000000 Да. ГК може мати як природне, так і біосинтетичне походження. Природний спосіб отримання забезпечує доступність і невисоку вартість, проте такі препарати зазвичай характеризуються нижчою якістю та ефективністю і можуть викликати алергічні реакції [1]. Натомість отримання ГК шляхом мікробіологічного синтезу з використанням культур бактерій дає змогу виробляти продукт із високим ступенем очищення та стабільними характеристиками.

Актуальність теми. Захворювання кістково-м'язової системи, зокрема остеоартрит (ОА), є однією з найпоширеніших патологій сучасного суспільства. ОА займає провідне місце серед захворювань суглобів синовіального типу [2]. Ефективним методом лікування захворювання виступають замісні внутрішньосуглобові ін'єкції ГК. У світовій практиці застосовуються розчини суглобової рідини з різними показниками молекулярної маси, концентрації та структури [3].

Український фармацевтичний ринок наразі не має власного виробництва препаратів на основі ГК для лікування остеоартриту. У зв'язку з цим пропонується використовувати гіалуронову кислоту для створення препарату «Гіалган» компанії Fidia Pharmaceutici S.P.A. (Італія). «Гіалган» — це 1%-й розчин ГК, отриманої мікробіологічним способом із *Streptococcus*

zooepidemicus ATCC 39920. Вибір цього методу обумовлений його економічністю, стабільним отриманням продукту з високим ступенем очищення та низьким рівнем алергенності, що суттєво перевершує промислові підходи [4, 5].

Гіалуронова кислота відіграє значущу роль у сучасній медицині та фармації завдяки своїм унікальним біологічним властивостям, таким як зволоження, протизапальна дія, стимуляція регенерації тканин і підтримка в'язко-еластичних характеристик синовіальної рідини. У контексті зростання захворюваності на остеоартроз, а особливо у людей похилого віку, виготовлення доступних і ефективних методів лікування стає все більш важливим. Біотехнологічний спосіб отримання ГК із безпечних і високопродуктивних штамів мікроорганізмів дозволяє знизити залежність від імпортової продукції, одночасно зменшуючи її собівартість[6].

Мета і завдання дослідження. Розробка біотехнологічного підходу до отримання гіалуронової кислоти за допомогою штаму *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 для створення лікарського препарату, призначеного для лікування остеоартрозу.

Для цього треба: провести аналіз фізико-хімічних властивостей гіалуронової кислоти та визначити її значення у фармакології. Дослідити сучасні методики біотехнологічного синтезу ГК. Оцінити переваги використання *Streptococcus zooepidemicus* штаму, як продуцента. Обґрунтувати потребу створення ефективного препарату на основі ГК для терапії остеоартрозу.

Об'єкт дослідження. Процес біотехнологічного синтезу гіалуронової кислоти.

Предмет дослідження. Штам *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 як продуцент для виробництва гіалуронової кислоти з лікувальною метою.

Методи дослідження. Статистичні - аналіз наукових джерел, лабораторне - мікробіологічне культивування, хімічний аналіз отриманого продукту, оцінка порівняльних характеристик з ринковими аналогами.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше запропоновано впровадження штаму *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 для українського виробництва гіалуронової кислоти. Цей підхід забезпечує отримання високочистого продукту з низькою алергенністю, має спрощений склад і доступну ціну поживного середовища, водночас штам забезпечує продуктивніше вироблення гіалуронової кислоти. Крім того, технологія відповідає сучасним екологічним та етичним вимогам.

Практичне значення результатів. Результат цієї роботи може стати основою для розробки вітчизняного препарату на основі гіалуронової кислоти. Це сприятиме задоволенню попиту на ефективне лікування остеоартрозу за доступною ціною, скороченню імпорту зарубіжної продукції та розвитку української фармацевтичної індустрії.

Особистий внесок здобувача. Прийняття участі у проведених дослідженнях, в зборі та обробці результатів дослідження.

РОЗДІЛ 1

ХАРАКТЕРИСТИКА ГІАЛУРОНОВОЇ КИСЛОТИ

ГК є складним полімером, утвореним залишками D-глюкуронової кислоти та D-N-ацетилглюкозаміна, які об'єднані у дисахаридні ланки. Цей полісахарид в складі міжклітинного матриксу, займаючи простір між молекулами колагену та еластину, таким чином забезпечуючи їхню стабільність. Основний компонент синовіальної рідини, гіалуронова кислота, має вплив на її в'язкість.

Молекулярна маса ГК змінюється залежно від джерела її отримання: (5 000 - 20 000 000). У людській синовіальній рідині середня молекулярна маса макромолекул становить близько 3 140 000 [1]. Розчин описаного полімеру вирізняються унікальними реологічними властивостями, які дозволяють їм діяти як в'язкоеластичний гель навіть при низьких концентраціях. За методикою кореляційної фотонної спектроскопії виявлено, що в розчинах макромолекули гіалуронової кислоти формують компактні згорнуті ланцюги з радіусом вигину близько 200 нм. Обмежена рухливість цих ланцюгів спричинена наявністю водневих зв'язків.

Стереохімічна стабільність молекули пояснюється геометрією дисахаридів: об'ємні замісники в піранозному кільці займають енергетично вигідні положення, тоді як менші атоми розташовуються менш оптимально. Гліканові зв'язки у структурі гіалуронової кислоти формуються між D-глюкуроною кислотою та аміноцукром β -(1→3)-зв'язками, а між аміноцукром і D-глюкуроною кислотою – β -(1→4)-зв'язками [7].

Полярні та неполярні сегменти полімерної структури надають гіалуроновій кислоті здатність хімічно взаємодіяти з різними агентами. Цю властивість використовують, наприклад, для створення матеріалів на основі поліелектролітних комплексів із застосуванням хітозану або в клінічних дослідженнях із метахроматичними барвниками.

Водневі зв'язки у структурі полімеру мають двояке значення: з одного боку, вони сприяють стабілізації макромолекул у розчині, але з іншого – підвищують жорсткість полімерної системи. Ці первинні зв'язки відіграють роль у формуванні вторинних і третинних структур гіалуронової кислоти. Наприклад, водні молекули можуть виступати своєрідними мостами між різними функціональними групами (Рис. 1.1).

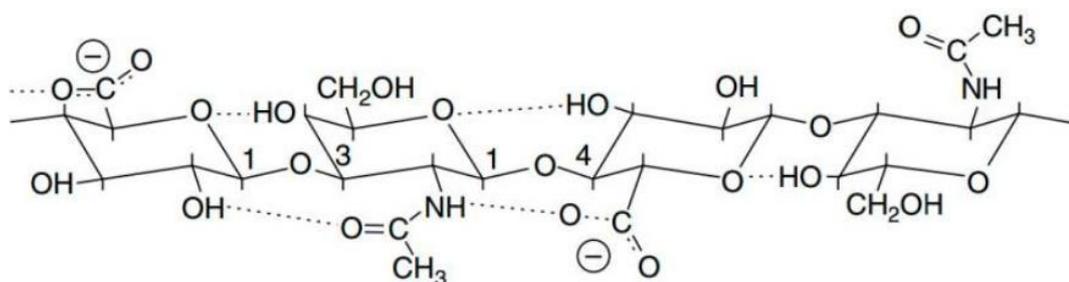


Рис.1.1. Утворення водневого зв'язку [7]

Полімери гіалуронової кислоти та її солей, включаючи солі амонію, магнію та лужних металів, мають гарну водорозчинність і демонструють високий рівень в'язкості навіть при низьких концентраціях. Крім того, у водному розчині гіалуронова кислота здатна утворювати тривимірні клітинні структури навіть при концентраціях нижче 1 мкг/мл.

Гідродинамічний об'єм гіалуронової кислоти залежить від сили іонів у розчині. При низькому вмісті натрій-хлориду (менше ніж 0,15 М), зростає електростатичне відштовхування між макромолекулами, що збільшує їхній загальний об'єм. Розмір таких макромолекул також визначається молекулярною масою.

Структура полімеру в розчині є чутливою до зміни рН середовища. Додавання кислот чи лугів зміщує баланс притягання і відштовхування. Сучасний метод ферментації мікроорганізмів не лише підвищив безпечність гіалуронової кислоти щодо алергійних реакцій, але й розширив можливості її застосування у фармацевтичній, косметичній та харчовій промисловостях.

Унікальна в'язкість розчинів гіалуронової кислоти зберігає свою значущість як у фізіологічних і біохімічних процесах, так і при розробці

терапевтичних, медичних, клітинних, біоінженерних, косметичних і харчових продуктів.

На рисунку 1.2 представлено залежність динамічної в'язкості розчинів гіалуринової кислоти різної молекулярної маси від швидкості зсуву за концентрації полімеру 10 мг/мл. Спостерігається, що при значних швидкостях зсуву динамічна в'язкість стає незалежною від молекулярної маси полімеру. Це пояснюється тим, що макромолекули полімеру орієнтуються вздовж напрямку потоку, і в таких умовах в'язкість визначається переважно концентрацією полімеру.

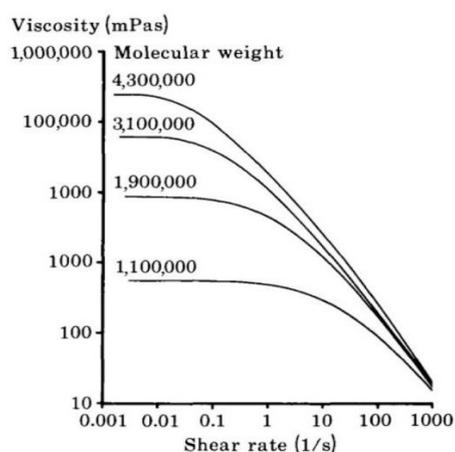


Рис.1.2. Динамічна в'язкість розчинів полімерів в залежності від молекулярної маси ГК та швидкості зсуву [7]

ГК - поширений компонент у медичних препаратах. Як і інші глікозаміноглікани вона здатна підвищувати осмоляльність розчинів. Показник осмоляльності збільшується із зростанням концентрації або молекулярної маси гіалуринової кислоти. Це має враховуватися виробниками для створення спеціалізованих формул їхньої продукції. Однак аналіз і порівняння осмоляльності подібних продуктів ускладнюється через різноманіття факторів, таких як індекс полідисперсності ГК, тип буферних розчинів, наявність додаткових полімерів, поверхнево-активних речовин, органічних осмолітів та консервантів [7].

Фізичні властивості гіалуронової кислоти

Фізичні властивості	Гіалуронові кислоти (Mw, kDa)
Реологічність	350, 680, 1800 – низька молекулярність, 1000, 2000, 3000, 4000 – середня омолекулярність 125, 241, 390, 598, 800, 961, 1270, 1430, 1620, 1770, 2040, 2150 – висока молекулярність
Розмір гідродинамічний	100, 500, 1000, 3000, 6000
Натяг поверхневий	100 – 5000
Адгезія	350-2000
Густина оптична	1430-1500
Швидкість ультразвуку	1430

Дослідження швидкості поширення ультразвуку в різноманітних умовах є корисним для визначення структурних, фізичних властивостей використовуваних матеріалів. Це дозволяє аналізувати макро- і мікроструктурні зміни, що виникають в процесі зшивання, склування та кристалізації і також оцінювати фізичні чи хімічні перетворення без ушкодження зразків.

В розчинах гіалуронової кислоти швидкість ультразвуку виявляє лінійну залежність від концентрації, аналогічно до багатьох інших полімерних розчинів за низьких концентрацій. Зі зростанням температури процес зниження молекулярної маси прискорюється, зокрема для гіалуронової кислоти в формі рідкій та порошкоподібній. Впродовж трьох годин нагрівання, при цьому температура повинна бути на рівні 90 °C (для обох форм) або 120 °C (лише для порошку) зниження молекулярної маси проходило значно інтенсивніше, ніж під впливом тривалішого нагріву за нижчої температури. Загалом було визначено, що розпад ГК із меншою молекулярною масою відбувається швидше, ніж для зразків із більшою молекулярною масою за помірних температур (наприклад, 3 години при

60 °C).

Гіалуронова кислота розкладається під дією активної форми кисню і є чутлива до дії різноманітних окислювачів, до яких віднесено озон, УФ випромінювання та перекис водню. У звичайних умовах при тривалому зберіганні ГК поступово руйнується, тому для мінімізації втрати її молекулярної маси слід зберігати її в холодильнику [7].

Сфери застосування гіалуронової кислоти. Вона присутня у більшості тканин і рідині організму, що зумовлює її широке застосування в медицині та косметології. Її біологічна активність значною мірою залежить від молекулярної маси. ГК з високою молекулярною масою проявляє властивості протизапальні. Реологічні характеристики роблять її незамінною в ролі протеза синовіальної рідини під час лікування суглобів. Також вона активно використовується в косметології та естетичній медицині як шкірний наповнювач, а в офтальмології – як складник штучних сліз.

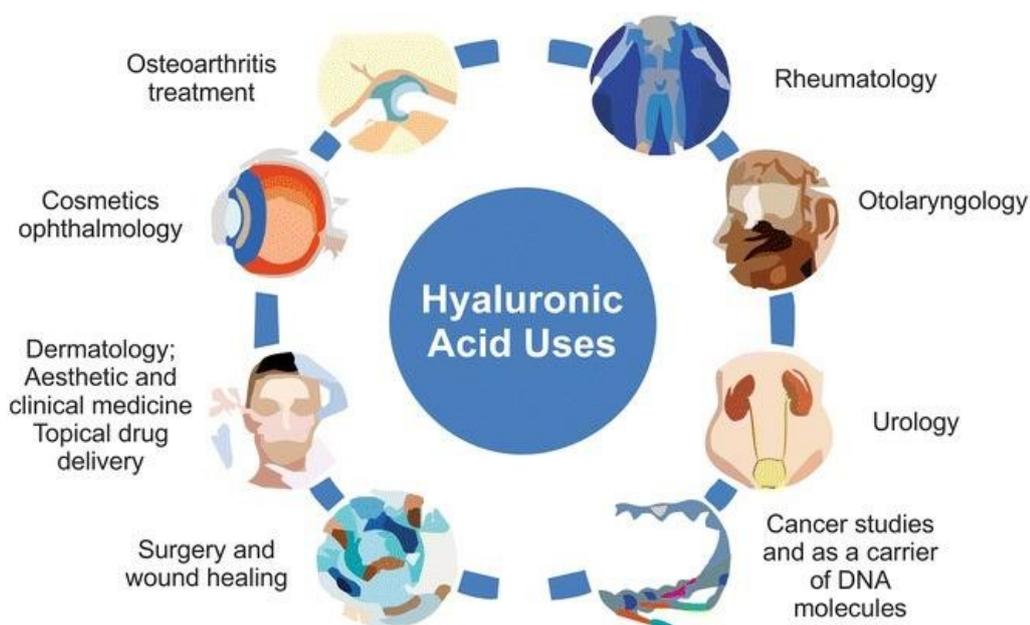


Рис.1.3. Сфери використання гіалуронової кислоти [7].

РОЗДІЛ 2

ХАРАКТЕРИСТИКА БІОАГЕНТА

2.1. Біоагент та поживне середовище

Гіалуронову кислоту вперше виділили в 1930-х роках. Спочатку її отримували з тваринних тканин, таких як гребінці, очі та хрящі. Однак, цей метод мав недоліки. Жоден з методів очищення не міг повністю усунути залишки білків і пептидів тваринного походження, що могли викликати алергічні реакції у людей, обмежуючи таким чином сферу її застосування.

У 1989 році став популярним новий метод отримання ГК за допомогою ферментації мікроорганізмів, здатних її синтезувати. Генна інженерія дозволила створити безпечний для людини штам стрептокока, який продукує гіалуронову кислоту на поверхні своїх клітин. Згодом ця кислота очищується і перетворюється у кінцеву форму – гелеподібну або порошкову.

Мікробний синтез ГК у яких основою є бактеріальний штам є більш економічно вигідним порівняно із використанням тваринної сировини. Це забезпечується зменшенням витрат на первинні матеріали та уникненням залежності від сезонних поставок. Такий метод дозволяє мати продукт зі стабільними характеристиками високого ступеня очищення, що мінімізує ризик алергічних реакцій і відповідає етичним стандартам [6].

На сьогодні основними мікроорганізмами-продуцентами є *Streptococcus* і генно-інженерний штам *Bacillus subtilis*, а також штам *Escherichia coli* [8]. У випадку *Bacillus subtilis* і *Escherichia coli* синтез гіалуронової кислоти здійснюється через плазмідні вектори, контрольовані сильним промотором *P_{grac}* [9]. Детальне дослідження ферментів, які каталізують цей синтез, відкриває можливості створення рекомбінантних систем у широкому спектрі мікроорганізмів. Першим генетично модифікованим організмом для синтезу цього біополімера став *Bacillus subtilis*, отриманий шляхом клонування гена *hasA* із стрептокока. Проте синтез був з обмеженою молекулярною вагою та

низьким виходом [10].

У конструкції *Escherichia coli* для експресії гіалуронової кислоти виявилось, що ці гени є токсичними при сильній транскрипційній активації [11].

Таблиця 2.1

Виробництво гіалуронової кислоти

Біоагент	Компоненти поживного середовища, г/л	Концентрація продукту, г/л	Час культивування, год	Особливості процесу культивування
<i>Bacillus subtilis</i> WB600	Сахароза 20,0 (NH ₄) ₂ SO ₄ 3,0 KH ₂ PO ₄ 6,5 Na ₂ HPO ₄ 4,5 Натрія цитрат 2,0 MgSO ₄ · 7H ₂ O 3,0 CaCl ₂ · 2H ₂ O 0,5 ; Кислота лимонна 100 FeSO ₄ · 7H ₂ O 20,0 MnSO ₄ · H ₂ O 5,0 CuSO ₄ · 5H ₂ O 2,0 ZnCl ₂ 2,0	3,7	54	Процес ферментації повинен проходити за рН 6,0, температури 32°C та з аерацією
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> ATCC 39920	Сахароза 20,0; Казеїну гідролізат 25,0; Екстракт дріжджів 3,5; K ₂ HPO ₄ 2,0; NaCl 1,5; MgSO ₄ × 7H ₂ O 0,4.	5	28	Процес ферментації повинен проходити за рН 7,0, температури 37°C та з аерацією
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> ATCC 35246	Глюкоза 50,0 Екстракт дріжджів 5,0 K ₂ HPO ₄ , 2,0 KH ₂ PO ₄ , 2,0 MgSO ₄ , 0,5 (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,5 Пептону 15	3	28	Процес ферментації повинен проходити за рН 7,0, температури 37°C та з аерацією

Гіалуронова кислота, продуктивана *Streptococcus zooepidemicus*, має ідентичну структуру до людської ГК, що є великою перевагою для біотехнологічного процесу. Ключовим ферментом для синтезу ГК є гіалуронансинтаза (*hasA*) в стрептококах, виконуючи функції каталізу об'єднання кислот і транспортування ланцюга ГК з клітини.

Для отримання ГК бактерії роду *Streptococcus* зазвичай культивують в

періодичних умовах [12]. Згідно з даними, велику кількість гіалуронової кислоти (5 г/л) синтезує *Streptococcus zooepidemicus*, а саме АТСС 39920, який є безпечним та генетично стабільним.

За допомогою бактерії роду стрептококів іншого штаму – *Streptococcus zooepidemicus*, а саме АТСС 35246, була отримана гіалуронової кислоти концентрація якої 3 г/л. *Bacillus subtilis* WB600 має низький вихід цільового продукту (на рівні 3,7 г/л) але вимагає значно більше часу на культивування. Тобто, найбільш ефективний продуцент гіалуронової кислоти є (АТСС 39920) *Streptococcus zooepidemicus*.

Таблиця 2.2

Ціна поживного середовища

Біоагент	Компоненти поживного середовища, г/л	Вартість компонентів на 1 літр середовища
Bacillus subtilis WB600	Сахароза 20,0	1,8
	(NH ₄) ₂ SO ₄ 3,0	0,06
	KH ₂ PO ₄ 6,5	0,28
	Na ₂ HPO ₄ 4,5	0,495
	Цитрат натрію 2,0	0,17
	MgSO ₄ ·7H ₂ O 3,0	0,027
	CaCl ₂ ·2H ₂ O 0,5	0,02
	Лимонна кислота 100	1,0
	FeSO ₄ ·7H ₂ O 20,0	0,5
	MnSO ₄ ·H ₂ O 5,0	0,0046
	CuSO ₄ ·5H ₂ O 2,0	0,25
ZnCl ₂ 2,0	0,3	
Вартість 1 л		13,90 грн
Streptococcus zooepidemicus АТСС 35246	Глюкоза – 50	3,2
	Дріжджовий автолізат –5	6,3
	K ₂ HPO ₄ – 2	0,12
	KH ₂ PO ₄ – 2	0,16
	(NH ₄) ₂ SO ₄ – 5	0,1
	Триптон –10	2,75
Вартість 1 л		12,60 грн
Streptococcus zooepidemicus АТСС39920	Сахароза 20,0	1,8
	гідролізат казеїну 25,0	6,6
	дріжджовий екстракт 3,5	4,4
	K ₂ HPO ₄ 2,0;	1,20
	NaCl 1,5;	0,09
	MgSO ₄ × 7H ₂ O 0,4	0,004
	Вартість 1 л	

Згідно з даними, представленими в таблиці 2.2, маємо висновок, що найдорожчим є середовище для *Bacillus subtilis*, що робить його економічно недоцільним для промислового використання. До того ж, штам синтезував ГК з низькою концентрацією.

Streptococcus, а це є бактеріальний штам демонструє порівняно невелику різницю у вартості поживних середовищ, проте вихід ГК у штама *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 є меншим.

Доцільно зробити остаточний вибір біологічного агента на 3 етапі. Треба провести розрахунок умовної вартості одиниці активності (таблиця 2.3).

Таблиця 2.3

Розрахунок умовної вартості 1 г гіалуронової кислоти

Біологічний агент	Максимальний вихід продукту, г/л	Собівартість 1 л середовища, грн	Орієнтовна вартість 1 г продукту, грн/г	Продуктивність ГК, мг/год
<i>Bacillus subtilis</i> WB600	3,70	13,90	3,80	0,25
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> ATCC 35246	3,03	12,60	4,15	0,44
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> ATCC 39920	5,00	13,12	2,60	0,46

Проаналізувавши надані дані, робимо висновок, щодо відмінностей у ціні компонентів ПС. *Streptococcus zooepidemicus* ATCC39920 мав найвищу продуктивність гіалуронової кислоти та у нього середня вартість компонентів, що робить його оптимальним вибором для біосинтезу цього продукту.

2.2. Розрахунок необхідної кількості компонентів для поживного середовища

Процес культивування триває 28 годин, а вихід продукту становить 5 г/л.

Синтезу гіалуронової кислоти та потреби:

1. Визначимо кількість вуглецю в 5 г гіалуронової кислоти. При цьому молекулярна маса ГК ($C_{28}H_{44}N_2O_{23}$) дорівнює 776. Відповідно у 776 г гіалуронової кислоти є 336 г вуглецю. Виходить, що для 5 г ГК кількість вуглецю становить: $(5 \times 336) / 776 \approx 2,16$ г.

2. Розрахуємо, яка маса сахарози містить 2,16 г вуглецю. Маючи формулу сахарози ($C_{12}H_{22}O_{11}$), обчислення виглядають так: $X = (2,16 \times 342,3) / 144 \approx 5,13$ г/л.

3. При цьому субстрат окиснюється до CO_2 , близько 40 % від маси, для отримання енергії, необхідної для метаболізму. Тому вміст сахарози у середовищі складе: $(5,13 \times 0,4) + 5,13 \approx 7,18$ г/літрів.

Потреби для синтезу біомаси:

1. В складі біомаси міститься на рівні 50 % вуглецю. Отже, у 4,61 г біомаси вуглецю дорівнює: $4,61 \times 0,5 = 2,3$ г.

2. Для такої кількості вуглецю треба приблизно: $(2,3 \times 342,3) / 144 \approx 5,47$ г вуглеводів.

3. Таким чином, вміст сахарози в середовищі для процесу синтезу біомаси та ГК складає: $5,13 + 5 \approx 10,13$ г/л.

Рахуємо джерело азотного живлення:

1. Припустимо, що біомаса на 10 % складається з азоту. У 4,61 г біомаси азоту буде: $4,61 \times 0,1 = 0,46$ г.

2. Для промислового виробництва ГК зазвичай використовується середовище з дріжджовим екстрактом як джерелом мінерального азоту. Склад дріжджового екстракту за основними амінокислотами дозволяє розрахувати потрібну його кількість.

3. Сумарний склад азоту в екстракті становить близько 31,74 %. Використовуючи співвідношення: $(100 \times 0,31) / X = 3,5$, необхідна концентрація дріжджового екстракту складе приблизно 11 г/л.

При розрахунку вміст азоту у гідролізаті казеїну ми бачимо, що цей показник становить 8 %.

1. Рахуємо: $4,61 \times 0,8$ маємо 3,68 г азоту.

2. Далі рахуємо вміст фосфору в середовищі. Відомо, що біомаса містить близько 3 % фосфору. Відповідно, для синтезу 4,61 г/л біомаси треба забезпечити певну кількість фосфору у середовищі, а саме $4,61 \times 0,03 = 0,13$ г/л.

3. Джерелом фосфору у промислових умовах виступає двозаміщений калій фосфорнокислий, це - K_2HPO_4 . Для визначення кількості K_2HPO_4 , потрібної для отримання 0,03 г фосфору, враховуємо розрахунок: $X = (136 \times 0,1) / 31 = 6$ г/л. Тому, при синтезі 4,61 г/л біомаси, в середовищі повинно бути присутньо 6 г K_2HPO_4 .

2.3. Морфолого-культуральні характеристики

Streptococcus equi субвид *zoepidemicus* представляє собою грампозитивну, бета-гемолітичну бактерію групи С за класифікацією Lancefield. Клітини мають кулясту форму, нерухомі, не створюють спор і мають діаметр менше за 2 мікрметри. Вони можуть розташовуватися парами або формувати ланцюжки. При культивуванні на агарі колонії розміром від 0,5 до 1,5 мм, круглу форму і непрозоре забарвлення, із гладкою, опуклою поверхнею [13].

Є факультативними анаеробами, оптимальна при цьому температура – 37°C, рН середовища – 6-7. *Streptococcus zoepidemicus* демонструє високу чутливість до антибіотиків, таких як пеніцилін, ампіцилін, нітрофурані та еритроміцин. Серед субстратів ферментації він переробляє D-глюкозу, сахарозу, лактозу, D-сорбіт, мальтозу та крохмаль. Проте ферментація D-маніту, гліцерину й інуліну відсутня. Основними продуктами ферментації *Streptococcus zoepidemicus* є молочна та гіалуронова кислоти. Регуляція процесу ферментації пов'язана з синтезом гіалуронової кислоти.

РОЗДІЛ 3

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА ГІАЛУРОНОВОЇ КИСЛОТИ

3.1. Потреба у гіалуронової кислоті

Природний синтез ГК в організмі знижується після 25-30 років, що супроводжується зростанням дефіциту цієї речовини. Ознаки цього процесу стають видно навіть візуально. Зокрема, відбуваються дистрофічні зміни у внутрішніх органах людини, це викликають дискомфорт і болісні відчуття, вимагаючи застосування гіалуронової кислоти разом із вітамінами та іншими лікарськими препаратами [14].

Недостатність гіалуронової кислоти має серйозні наслідки: дискомфорт у суглобах (особливо колінних), пересушення і зневоднення шкіри, утворення мімічних зморшок, уповільнена регенерація епідермісу, а також зниження рівня гіалуронової кислоти у тілі ока, що може спричинити катаракту. Особливої уваги заслуговує необхідність використання гіалуронової кислоти як замісника синовіальної рідини, як ефективного засобу при лікуванні остеоартрозу.

При розвитку остеоартрозу знижується як природна концентрація гіалуронової кислоти, так і її середня молекулярна маса, яка негативно впливає на структурні та біомеханічні характеристики суглобів. Збільшити її можна за допомогою ін'єкцій внутрішньосуглобово, це допомагає відновлювати властивості в'язко-еластичності синовіальної рідини, а також чинить хондропротекторний, протизапальний і знеболювальний ефекти.

Покращуючи якість синовіальної рідини відбувається активація процесу регенерації тканин суглобового хряща, гіалуронова кислота позитивно впливає на функціонування суглобів.

Сьогодні популярність набувають неінвазивні методи лікування, що стимулюють природні процеси відновлення організму, поліпшують стан після травмування або спрощують боротьбу із симптомами без ризику небажаних побічних ефектів. До таких методів належать уколи гіалуронової

кислоти, які є частиною нового терапевтичного напрямку, відомого як ортобіологія [15].

Згідно з клінічними дослідженнями, внутрішньосуглобові ін'єкції гіалуронової кислоти й кортикостероїдів були порівняні серед пацієнтів із остеоартрозом трапецієп'ясткового суглоба. Обидва методи продемонстрували однакову здатність зменшувати вираженість болю, проте ефект від використання гіалуронової кислоти був більш тривалим [16].

Обрання потужності виробництва розрахунковим методом

Станом на останні роки кількість осіб старше 50 років становить приблизно (8,878 млн) це приблизно 29 % усього населення.

Залежно від тяжкості перебігу захворювання (легка, середня чи тяжка форми), лікувальні підходи суттєво відрізняються. Згідно з даними Population Pyramid.net та з урахуванням результатів, поширеність остеоартрозу колінного суглоба мають легкої форми становить близько 20%.

$$8,878 \text{ млн} - 100 \% ;$$

$$X - 20\%$$

$$X = 1\,775\,600$$

Станом на 2024 рік, в нашій країні ін'єкції проти остеоартрозу завозять із закордону.

Розглядається можливість аналізу лікарських засобів, які містять гіалуронову кислоту, та вироблені іншими країнами та доступні для українського фармацевтичного ринку. У таблиці 3.1 представлено перелік препаратів від різних країн-імпортерів, що застосовуються проти остеоартрозу.

Неширокий вибір медикаментів на фармацевтичному ринку нашої країни, пропонується організувати виробництво ГК для одного з підприємств, яке виготовляє препарат «Гіалган». Цей препарат має доступну вартість: курс із п'яти ін'єкцій (по одній на тиждень впродовж п'яти тижнів) обійдеться одній людині у 3385 гривень. Враховуючи, що остеоартроз є найпоширенішим захворюванням серед населення віком старше 50 років,

така ціна є цілком прийнятною для середньостатистичного споживача цієї вікової групи. Пропонується у таблиці 3.1. роздивитися варіанти лікарських засобів.

Таблиця 3.1.

Наявність на українському ринку препаратів

Назва препарату та його виробник	Вміст натрій гіалуронат у 2 мл розчину, мг [Вартість, грн
Гіалган 17 , Фідія, Італія	20	677
Суплазин-1-SHOT18, Біонік Тео, Ірландія	60	4149
Сертобек-про19, Ворд Медесин, Великобританія	60	3113
Ферматрон плюс20, Хайєлтек, Великобританія	30	2200
Остеніл плюс 21, Хімедіка Германія	40	3050

Станом на 2024 рік, ін'єкція для лікування в Україні постачає компанія «Фідія Фармацевтика», однак цей препарат «Гіалган» готують в Італії.

Припускаючи, що виробництво стане конкурентоспроможним за умови покриття 1% фармацевтичного ринку України, можна розрахувати потенційну потребу в препараті. Враховуючи загальну кількість населення:

1775600 людей – це 100%, отже, 1% складе:

$$X = (1\ 775\ 600 \times 1) / 100 = 17\ 756 \text{ осіб.}$$

Таблиця 3.2

Витрати гіалуронової кислоти населенням за рік

Потреба населення у кислоті гіалуронової	Спосіб застосування	Кількість 1 для особи, мг	Кількість на добу, мг	Кількість хворих	Розрахункова кількість препарату на хворих, мг
Синовіальна рідина (замінник)	1 раз у тиждень впродовж 5 тижнів	100	20	17756	1775600

Таким чином, щоб забезпечити лікування цієї кількості пацієнтів, необхідна кількість препарату наведено у таблиці 3.2 і становитиме:

$$17\,756 \text{ осіб} \times 100 \text{ мг} = 1\,775\,600 \text{ міліграм.}$$

Кількість синтезованої ГК продуцентом *Streptococcus zooepidemicus*, а саме ATCC 39920 це 5 г на 1 літр вже культуральної рідини. В таких умовах повний цикл культивування триває 28 годин. Для отримання 1775,6 г (або 1775600 мг) гіалуронової кислоти потрібно використовувати наступний розрахунок об'єму культуральної рідини:

$$5 \text{ г} - 1 \text{ л}$$

$$1775,6 \text{ г} - X \text{ л}$$

$$X = 355,12 \text{ літрів культуральної рідини.}$$

Однак, з урахуванням втрат цільового продукту під час виділення (38%), необхідний об'єм культуральної рідини становитиме:

$$355,12 / 0,62 \approx 572,774 \text{ л.}$$

Для виробництва зазначеного об'єму ГК потрібно визначити параметри роботи ферментера та кількість циклів ферментації. *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 виробляє 5 г/л продукту [12]. Розрахунки проводяться виходячи з мінімально можливих робочих днів (30 днів) і максимальних (330 днів). Для цього прикладу береться значення у 310 трудоднів.

Робота ферментера складається з двох основних етапів: безпосередньо культивування (28 годин) та підготовчих операцій (10 годин). Таким чином, тривалість одного циклу роботи у ферментері становить:

$$T_{\text{цф}} = T_{\text{ф}} + T_{\text{по}} = 28 + 10 = 38 \text{ год.}$$

Підготовчі операції включають такі етапи:

- огляд та миття – 2 години,
- перевірка герметичності – 2 години,
- стерилізація – 2 години,
- охолодження – 1 година,
- завантаження середовища – 1,5 години,
- засів – 0,5 години,
- вигрузка культуральної рідини – 1 година.

На основі цих параметрів можна виконати подальші розрахунки об'єму ферментера, а також кількості виробничих циклів для отримання необхідної кількості продукту (572,774 л гіалуронової кислоти).

За умови 300 робочих діб, добовий об'єм продукту (V_d) розраховується як $1,8 \text{ м}^3$.

$$\text{Рахуємо : } V_d = V_{gp}/T_{pd} = 572,774/310 = 1,8 \text{ м}^3.$$

Об'єм продукту за один цикл ($V_{кр}$) становить 3 м^3 із врахуванням тривалості циклу і коефіцієнтів.

$$\text{Підрахунок : } V_{кр} = (K_1 \times V_d \times T_{цф})/24 = (1,1 \times 1,8 \times 38)/24 = 3 \text{ м}^3/\text{цикл}$$

Втрати культуральної рідини через краплевинос прийнято в розмірі 1%, оскільки використовується продуцент-факультативний анаероб. Для забезпечення біосинтезу розраховано, що загальний об'єм середовища та посівного матеріалу (V_f) складе $3,3 \text{ м}^3$.

$$\text{Тобто, } V_f = V_{кр}/(1-E_f) = 3/0,9 = 3,3 \text{ м}^3$$

При коефіцієнті заповнювання ферментера 0,6 його геометричний об'єм визначений як $5,5 \text{ м}^3$.

$$V_{гф} = V_f/K_{зф} = 3,3/0,6 = 5,5 \text{ м}^3$$

Найближчий доступний стандартний ферментер має об'єм $6,3 \text{ м}^3$.

Потрібно синтезувати $3,3 \text{ м}^3$ культуральної рідини. Для цього важливо врахувати, що під час процесу відбуваються втрати через краплевинос, а це 10%. З урахуванням цих втрат об'єм, який слід підготувати, розраховується за формулою:

$$V_{роб.1} = V_{пц} / 1 - E_f = 3,3 / 1 - 0,1 = 3,66 \text{ м}^3$$

де:

- $V_{пц}$ — необхідний кінцевий обсяг культуральної рідини ($3,3 \text{ м}^3$),
- E_f — коефіцієнт втрат (10% або 0,1).

Отже, щоб забезпечити потрібного обсягу враховується підготовка $3,66 \text{ м}^3$ культуральної рідини.

Для вибраного коефіцієнта заповнення ($K_{зап} = 0,6$) обчислюємо

можливий об'єм ферментера (V_{ϕ}), який дорівнює:

$$V_{\phi} = V_{\text{роб.1}} / K_{\text{зап}} = 3,66 / 0,6 = 6,1 \text{ м}^3$$

Приймаємо стандартний ферментер з найближчим об'ємом: ($V_{\phi} = 6,3$).

Уточнюємо наш коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап}} = V_{\text{роб.1}} / V_{\phi} = 3,66 / 6,3 = 0,58$$

Кількість ПМ у ферментері ($E_{\phi 1}$) становить 10 % від об'єму ПС. Тоді об'єм ПС у ферментері:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}} / 1 + E_{\phi 1} = 3,66 / 1 + 0,1 = 3,32 \text{ м}^3$$

Об'єм посівного матеріалу тоді буде:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 3,66 - 3,32 = 0,34 \text{ м}^3$$

Щоб отримати $0,34 \text{ м}^3$ ПМ в інокуляторі з врахуванням втрат, під час краплевиносу із колектора відпрацьованого повітря ($E_{\phi 2}$), у розмірі 10 %, об'єм ПС та посівного матеріалу у цьому апараті визначається як:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}} / 1 - E_{\phi 2} = 0,34 / 1 - 0,1 = 0,377 \text{ м}^3$$

При заданому коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,6$ визначаємо імовірний об'єм ферментера (V_{ϕ}), що дорівнює:

$$V_{\phi} = \frac{V_{\text{роб.}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{0,377}{0,6} = 0,628 \text{ м}^3$$

Приймаємо найближчий стандартний ферментер з об'ємом $V_{\phi} = 0,63 \text{ м}^3$ і уточнюємо прийнятий коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{V_{\phi}} = \frac{0,377}{0,63} = 0,59$$

Кількість ПМ для ферментера ($E_{\phi 2}$) становить 10% від загального об'єму поживного середовища. Тому, об'єм ПС у ферментері рахуємо за формулою:

$$V_{\text{пс2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{1 + E_{\phi 2}} = \frac{0,377}{1 + 0,1} = 0,342 \text{ м}^3$$

Об'єм посівного матеріалу розраховуємо так:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 0,377 - 0,342 = 0,035 \text{ м}^3$$

Для отримання 35 л ПМ в інокуляторі враховуємо втрати, спричинені краплиносом, що становлять 10 %. Розрахункова кількість ПС та ПМ у посівному апараті:

$$V_{\text{роб.3}} = \frac{V_{\text{пм2}}}{1-E_{\phi 2}} = \frac{35}{1-0,1} = 38,9 \text{ л}$$

При обраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,7$ визначається необхідний геометричний об'єм ферментера:

$$V_{\phi} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{38,9}{0,7} = 55,6 \text{ л}$$

Найближчий стандартний ферментер об'ємом $V_{\phi} = 0,06 \text{ м}^3$ (60 л), після чого уточнюється коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{V_{\phi}} = \frac{38,9}{60} = 0,64$$

Кількість ПМ для ферментера рахуємо як 10 % від об'єму ПС. Таким чином, кількість ПС в ферментері:

$$V_{\text{пс3}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{1+E_{\phi 2}} = \frac{38,9}{1+0,1} = 35,4 \text{ л}$$

Кількість ПМ розраховується як:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 38,9 - 35,4 = 3,5 \text{ л}$$

Для отримання 3,5 літрів ПМ в інокуляторі враховуються ті ж втрати через краплиносом, що становлять 10 %. Розрахунок потребує визначення загального об'єму ПС та ПМ у посівному апараті:

$$V_{\text{роб.4}} = \frac{V_{\text{пм3}}}{1-E_{\phi 2}} = \frac{3,5}{1-0,1} = 3,89 \text{ л}$$

При обраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,75$ необхідний об'єм ферментера становить:

$$V_{\phi} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{3,89}{0,75} = 5,18 \text{ л}$$

Стандартний ферментер об'ємом $V_{\phi} = 6 \text{ л}$ приймається, після чого уточнюється коефіцієнт заповнення. Це значення незначно перевищує

допустиме, тому рішення зберегти ферментер об'ємом 6 л є прийнятним.

$$K_{\text{зап}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{V_{\phi}} = \frac{3,89}{6} = 0,64,$$

Для цього випадку кількість ПС у ферментері буде:

$$V_{\text{пс4}} = \frac{V_{\text{роб.4}}}{1+E_{\phi 2}} = \frac{3,89}{1+0,1} = 3,53 \text{ л}$$

Кількість Пм розраховується як:

$$V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб.4}} - V_{\text{пс4}} = 3,89 - 3,53 = 0,36 \text{ л}$$

Щоб отримати необхідну кількість інокуляту для апарату ($V_{\text{пм4}} = 0,36$ л), використовуються колби об'єм яких = 750 мл з коефіцієнтом їх заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$. Розрахунок потрібної кількості колб виглядає так:

$$N = \frac{V_{\text{пм4}}}{V_{\text{колб}} * K_{\text{зк}}} = \frac{360}{750 * 0,2} = 2,4$$

Виходить, що для отримання ПМ достатньо 3 колби. Таким чином, весь процес підготовки ПМ для того, щоб забезпечити виробничий біосинтез в ферментері об'ємом 6,3 м³ із коефіцієнтом заповнення 0,6 та проходить у чотири послідовні етапи.

3.2. Біосинтез гіалуронової кислоти

Під час культивування *Streptococcus zooepidemicus* сахароза виступає джерелом вуглецю та енергії. Оскільки у базі Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes відсутні дані про шляхи катаболізму ростового субстрату для штаму *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920, для моделювання метаболічного шляху синтезу цільового продукту були використані інші наукові публікації. Інформація про сам процес синтезу також не знайдена серед інших штамів, представлених у KEGG [22].

Спираючись на ці припущення, для розробки катаболічного шляху сахарози використаний процес гліколізу (шлях Ембдена-Меєргофа-Парнаса), який описаний у KEGG та іноземних дослідженнях. Схема перетворення

сахарози наведена на рисунку 3.1. Сахароза в системі транспорту PTS ЕПВСА спершу перетворюється на сахарозо-6-фосфат. Потім при допомозі ферменту бета-фруктофуранозидази вона трансформується у фруктозу-1-фосфат. Далі фруктоза-1-фосфат під дією глюкозо-6-фосфат ізомерази конвертується у β -D-фруктозу 6-фосфат.

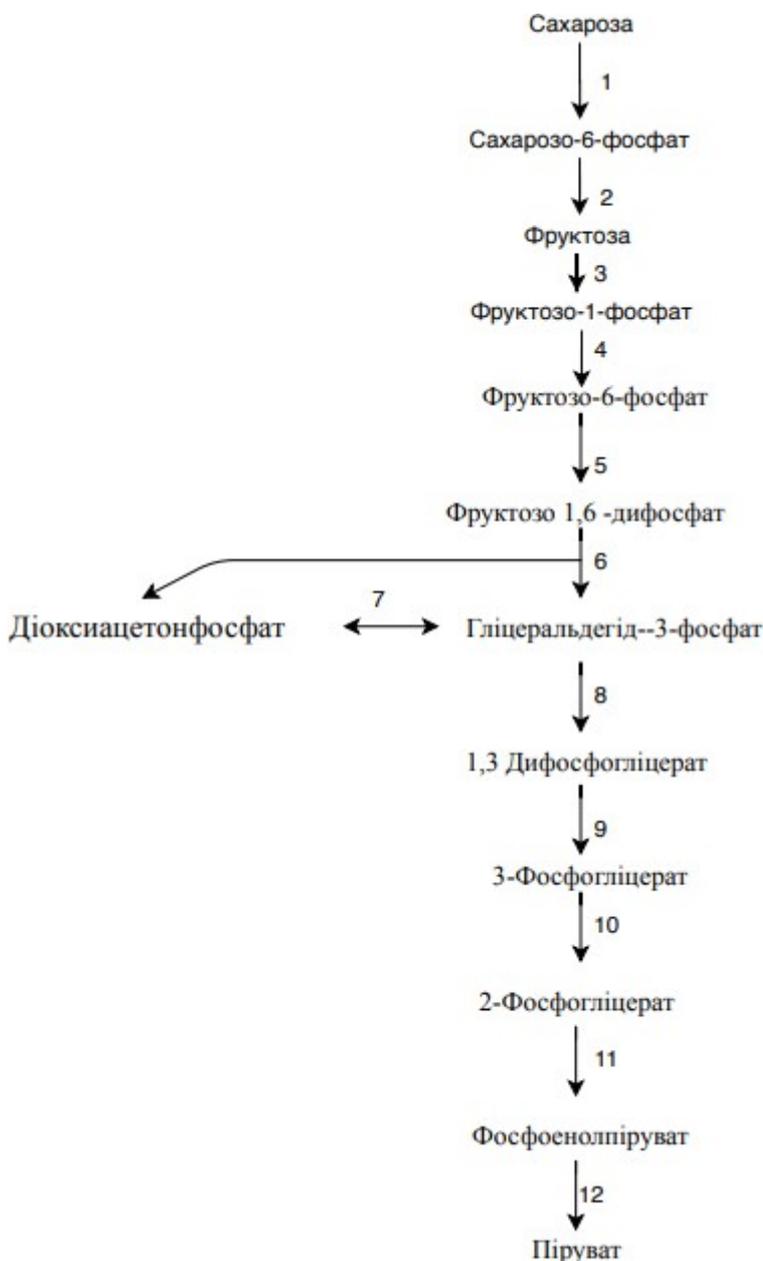


Рис 3.1. Катаболізм сахарози. Шлях Ембдена-Мейргофа-Парнаса
Ферменти: 1 – система сахарози - PTS ЕПВСА; 2 – бета-фруктофуранозидаза; 3 – фруктокіназа; 4– глюкозо-6-фосфат ізомераза; 5 – фосфотруктокіназа (глюкокіназа); 6 – фруктозодифосфат альдолаза; 7 – тріозофосфатізомерази; 8 – гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа; 9 – фосфогліцераткіназа; 10 – фосфогліцератмутаза; 11 – енолаза; 12 – піруваткіназа.

Процес активації β -D-фруктози 6-фосфату до β -D-фруктози 1,6-фосфату забезпечується ферментом фосфотруктокіназою (глюкокіназою). Потім фруктозодифосфатальдолаза каталізує утворення гліцеральдегіду-3-фосфату та діоксіацетонфосфату з β -D-фруктози 1,6-фосфату. Під впливом тріозофосфатізомерази діоксіацетонфосфат перетворюється на гліцеральдегід-3-фосфат.

Гліцеральдегід-3-фосфат відіграє важливу роль у подальшому катаболізмі сахарози. Під впливом ферменту гліцеральдегідфосфатдегідрогенази він перетворюється на гліцерат-1,3-бісфосфат, який після дії фосфогліцераткінази трансформується у гліцерат-3-фосфат.

Подальші зміни за участю фосфогліцератмутази перетворюють гліцерат-3-фосфат на гліцерат-2-фосфат. Після цього фермент енолаза каталізує перехід гліцерату-2-фосфату у фосфоенолпіруват. Заключною стадією є утворення пірувату з фосфоенолпірувату за участі ферменту піруваткінази.

Біотрансформація сахарози у гіалуринову кислоту відбувається під час розвитку *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920, а сахароза використовується як основне джерело вуглецю. Катаболізм жирних кислот призводить до утворення ацетил-КоА, з якого можуть синтезуватися ацетат і етанол. Анаплеротичні реакції, такі як карбоксилювання фосфоенолпірувату та пірувату, допомагають компенсувати втрати інтермедіатів ЦТК.

L-лактатдегідрогеназа сприяє утворенню молочної кислоти, що може інгібувати концентрацію гіалуринової кислоти. Фруктоза розкладається на глюкозо-6-фосфат, який шляхом катаболізму перетворюється на глюкозо-1-фосфат і УДФ-глюкозу. У результаті утворюється УДФ-глюкуронова кислота, яка залучається у синтез гіалуринової кислоти.

Фруктоза-6-фосфат ізомеризується з використанням глютаміну як донора аміногрупи за допомогою ферменту глютамін:фруктоза-6-фосфатної трансамінази. Наступна реакція з ацетил-КоА призводить до утворення глюкозамін-1-фосфату, який зв'язується з УДФ, формуючи УДФ-N-

ацетилглюкозамін.

Синтез гіалуронової кислоти починається за участю УДФ-N-ацетилглюкозаміну та глюкуронової кислоти під впливом ферменту гіалуронан-синтази. Готова молекула складається з багаторазово повторюваних дисахаридних блоків, утворених чергуванням залишків глюкуронової кислоти і N-ацетилглюкозаміну, які з'єднані β -1,3- та β -1,4-глікозидними зв'язками.

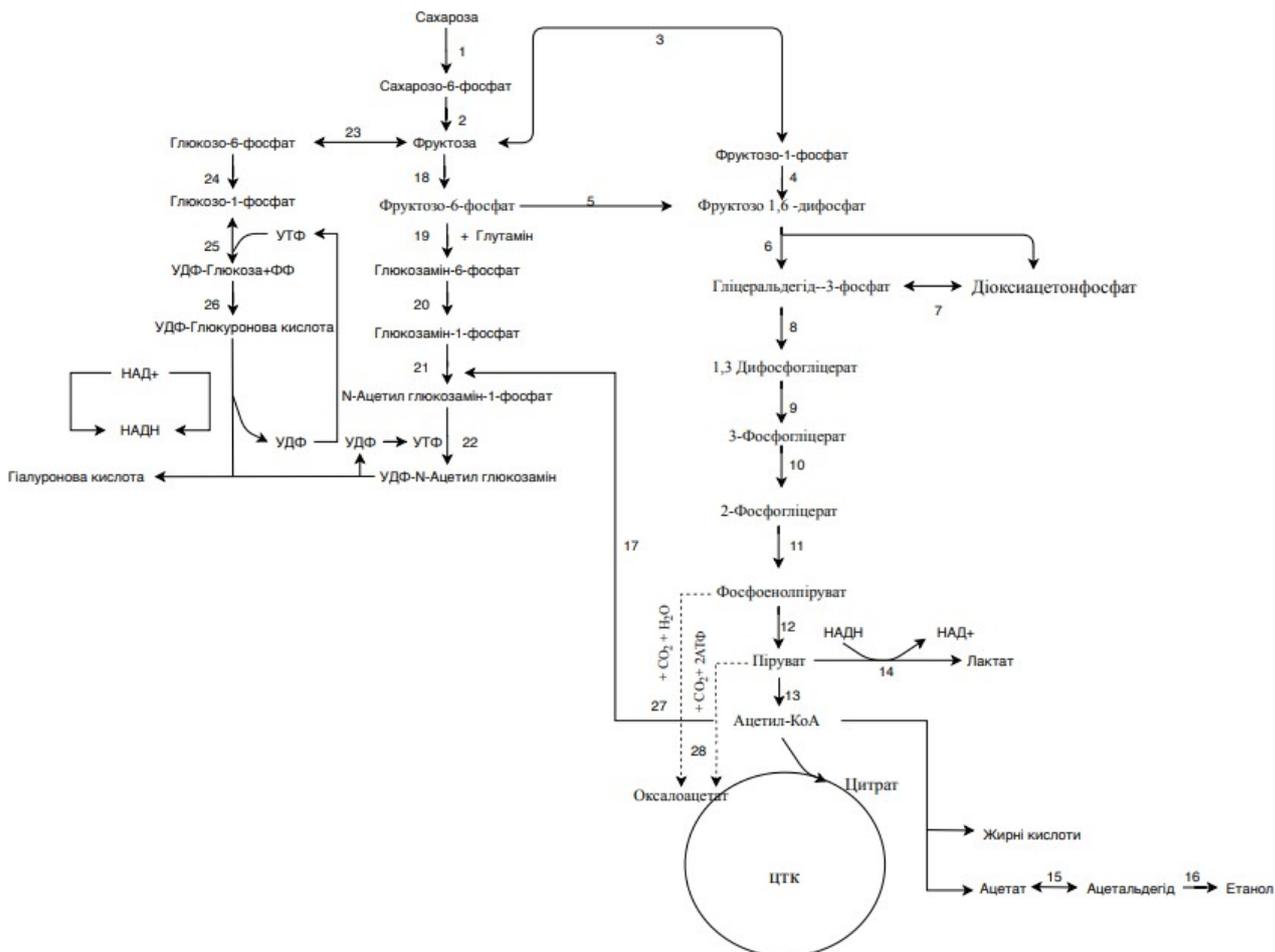


Рис. 3.2. Шлях біосинтезу

Ключові ферменти: 1. система сахарози PTS ЕПВСА; 2. бета-фруктофуранозидаза; 3. 1-фосфофруктокіназа; 4. 1-фосфофруктокіназа; 5. 3-фруктозо-1,6-біфосфатаза; 6. фруктозодифосфатальдолаза; 7. триозофосфатізомераза; 8. гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа; 9. фосфогліцераткіназа; 10. 2,3-дифосфатзалежна фосфогліцератмутаза, фосфогліцератмутаза; 11. енолаза; 12. піруваткіназа; 13. піруватдегідрогеназа;

14. L-лактатдегідрогеназа; 15. ацетил-КоА синтетаза; 16. алкогольдегідрогеназа; 17. N-ацетилглюкозамін-6-фосфатна деацетилаза; 18. фруктокіназа; 19. За рахунок глютаміну, як донора аміногрупи та ферменту глютамін - фруктоза-6-фосфатна трансаміназа (ізомеризується); 20. фосфоглюкозамін мутаза; 21. глюкозамін-1-фосфат N-ацетилтрансфераза; 22. УДФ-N-ацетилгалактозаміндифосфорилаза; 23. глюкозо-6-фосфатна ізомераза; 24. фосфоглюкомутаза; 25. УТФ - глюкозо-1-фосфатнауридилілтрансфераза; 26. УДФ-глюкоза 6-дегідрогеназа. 27. гіалуронан-синтаза.

3.3. Обрання технологічної схеми

Тип ферментера залежить від умов культивування, тому його конструкція та обладнання можуть варіюватися. Обираючи спосіб культивування та враховуючи фізіолого-біохімічні особливості продуцента, доцільно підбирати оснащення, яке забезпечить необхідне середовище для ефективного процесу.

Для покращення масообмінних процесів та рівномірності культуральної рідини використовується перемішувальний пристрій із частотою обертання 200 об/хв [27].

Тк як культивування продуцента гіалуронової кислоти потребує застосування такого пристрою, оптимальним вибором є двох'ярусна лопатева мішалка. Її конструкція сприяє суспендуванню та розчиненню компонентів, проста в обслуговуванні, полегшує очищення та збирання ферментера. На відміну від турбінної мішалки, яка генерує значно інтенсивніше перемішування, лопатева мішалка є безпечнішою для біологічного агента, адже сильне перемішування може пошкодити капсули, що містять гіалуронову кислоту.

Для забезпечення аерації ферментер укомплектовано барботером для подачі повітря та відведення відпрацьованих газів. Температурний режим підтримується за допомогою сорочки та температурного датчика. Контроль рівня рН здійснюється за допомогою відповідного датчика.

Коефіцієнт заповнення ферментера поживним середовищем становить 0,6 від його геометричного об'єму, залишаючи простір для компенсації підвищення рівня рідини через аерацію. Ферментер оснащений автоматичною системою стерилізації та передбачає стерильне внесення інокуляту, наявність портів для забору проб, а також установку датчиків контролю піни, тиску, рН, температури та оптичної густини. Передбачено механізм подачі газів і систему автоматизації для управління процесом [28].

Щодо підготовки аераційного повітря важливо враховувати, що *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 є факультативним анаеробом. При цьому ферментація можлива в анаеробних умовах, а аеробний режим значно підвищує вихід гіалуронової кислоти [29].

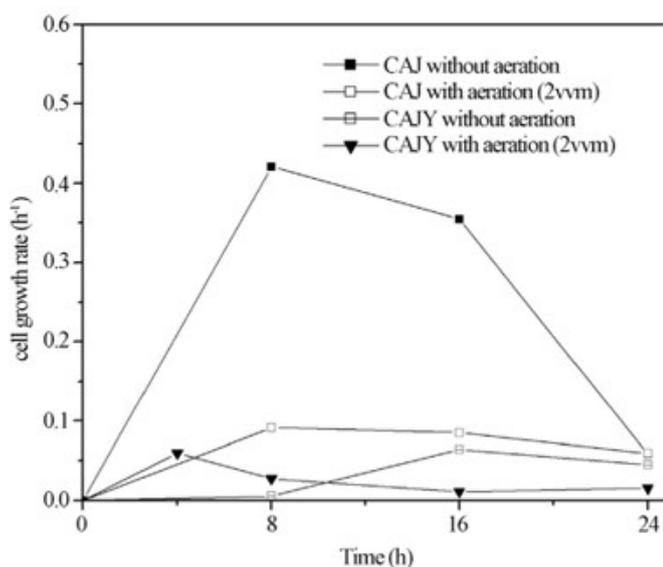


Рис 3.3. Процес Ферментації бактерії *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 в умовах аеробних [29].

У лабораторних боксах, де виконуються роботи із посівними культурами та інокулятами, для знезараження повітря використовують ультрафіолетові лампи. Стерилізацію повітря, необхідного для вирощування посівного матеріалу та виробничого культивування, проводять за допомогою фільтрів грубого очищення та індивідуальних фільтрів. Основні вимоги до фільтрувальних волокон включають високу пилоємність і ефективно

функціонування при мінімальних перепадах тиску до та після фільтра.

Фільтри індивідуальні розташовують безпосередньо перед ферментерами, посівними апаратами або інокуляторами. Головні фільтри, у яких всередині набивне волокно, встановлюють на головному колекторі аераційного повітря в цехах ферментування. З їх допомогою видаляється близько 98% мікроорганізмів, тоді як індивідуальні фільтри з надтонкими мембранами або волокнами, які здатні затримувати мікроорганізмів до 99,999% [30].

Стерилізація поживного середовища. Максимальна продуктивність синтезу гіалуронової кислоти досягається при культивуванні штаму *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 у середовищі такого складу (г/л): сахароза – 20,0; гідролізат казеїну – 25,0; дріжджовий екстракт – 3,5; K_2HPO_4 – 2,0; NaCl – 1,5; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,4.

Згідно з розрахунками, виробничий процес біосинтезу відбувається у ферментері об'ємом 6,3 м³, у якому міститься 3,32 м³ поживного середовища. Етапи підготовки інокуляту включають попереднє культивування в колбах, а також інокуляторах об'ємом 6 і 60 л.

На першому етапі слід підготувати 0,36 л поживного середовища в трьох колбах об'ємом 750 мл кожна. Стерилізацію проводять у автоклаві Panasonic (SANYO) MLS-3781L об'ємом 3 л відповідно до таких умов:

- **Композиція А** (сахароза, гідролізат казеїну, дріжджовий екстракт) — температура 112 °С, час стерилізації 20 хв.

- **Композиція Б** (NaCl, K_2HPO_4) — температура 131 °С, час стерилізації 40 хв.

- **Композиція В** ($MgSO_4 \times 7H_2O$) — температура 131 °С, час стерилізації 40 хв.

На наступному (етап 2) створюється 3,53 л середовища поживного в інокуляторі об'ємом 6 л за аналогічним поділом компонентів на композиції.

Третій етап виробництва передбачає підготовку 35,4 л середовища (див розрахунки в розділі 3) за допомогою посівного апарату об'ємом на 60 л. Для

стерилізації використовується автоклав Tuttnauer D-line 5050 ML об'ємом 100 л.

Режими для кожної композиції залишаються аналогічними попереднім етапам. При стерилізації солей NaCl та K_2HPO_4 в кислотному середовищі (рН 4,0–4,5) запобігають утворенню осаду магнійфосфатів. Для підкислення середовища використовується 6%-й розчин HCl із розрахунковою кількістю 2 мл/л середовища. Наприклад, для об'єму 35,4 л потрібно додати 70,8 мл цього розчину. Після стерилізації (при 131 оС, впродовж 40 хв). рН вирівнюють до значення 7 за допомогою еквівалентної кількості стерильного розчину NaOH.

На четвертому етапі необхідно отримати 342 літри живильного середовища (див. розділ 3). Середовище розподіляється на наступні композиції:

Композиція А: сахароза, казеїновий гідролізат, дріжджовий екстракт (режим стерилізації: 112 °С, 20 хвилин).

Композиція Б: NaCl, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \times 7H_2O$ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хвилин).

Для підкислення живильного середовища використовується розчин соляної кислоти за пропорцією 2 мл титрувального агента на кожен літр середовища. Отже, для певного випадку: 342 літри \times 2 мл = 684 мл 6%-го розчину соляної кислоти. Цей обсяг необхідний для стерилізації композиції Б у ферментері об'ємом 0,63 м³.

Після завершення стерилізації стабілізують рівень рН до 7 за допомогою 6%-го розчину стерильного гідроксиду натрію. Для цього також розраховують потребу: 342 літри \times 2 мл = 684 мл 6%-го розчину NaOH, який використовується для стерилізації композиції Б у тому ж ферментері.

На фінальному етапі виробництва проводиться біосинтез з об'ємом живильного середовища 3,32 м³. Його також розділяють на композиції:

Композиція А: сахароза, казеїновий гідролізат, дріжджовий екстракт (режим стерилізації: 112 °С, 20 хвилин).

Композиція Б: NaCl, K₂HPO₄, MgSO₄ × 7H₂O (режим стерилізації: 131 °C, 40 хвилин).

Підкислення середовища для цього етапу відбувається за тим самим принципом: 3320 літрів × 2 мл = 6640 мл 6%-го розчину соляної кислоти для стерилізації композиції Б у ферментері об'ємом 6,3 м³.

Після цього стабілізують рівень рН до 7 за допомогою: 3320 літрів × 2 мл = 6640 мл 6%-го розчину NaOH для стерилізації композиції у цьому ж ферментері.

Після завершення всіх етапів живлення переходять до виділення та очищення цільового продукту. Протягом свого життєвого циклу бактерія *Streptococcus zooepidemicus* ATCC39920 формує капсулу, яка слугує захистом від негативного впливу зовнішнього середовища (наприклад, від бактеріофагів або найпростіших організмів, а також попереджає денатурацію клітинних білків).

Ця капсула є природним полісахаридом і включає ланцюжки моносахаридів. До них належать глюкуронова кислота (уронової кислоти) та глюкозамін (аміноцукри). Усі вони разом утворюють полімерну структуру – гіалуронову кислоту. Для початку процесу її виділення необхідно руйнувати клітинні капсули бактерій.

Після завершення біосинтезу гіалуронова кислота містить домішки, такі як залишки клітин продуцента, високомолекулярні білки та залишкові цукри. На початку виділення ферментаційна суміш об'ємом три кубічних метри перекачується через перестальтичні насоси в резервуар об'ємом чотири кубічних метри. Температура в резервуарі підтримується в діапазоні від 15 до 25 °C (оптимально – 20 °C), а рівень рН – на позначці 7.

Процес виділення гіалуронової кислоти (ГК) розпочинається з руйнування капсул клітин *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 термічним методом. Вплив температури сприяє руйнуванню капсул, що забезпечує вивільнення ГК у культуральну рідину. Після цього важливим етапом є видалення біомаси, оскільки бактерії більше не потрібні, а сам продукт уже

міститься в рідкій середовищі. Для відокремлення біомаси можна використовувати такі методи, як фільтрація, сепарація чи центрифугування.

Після виділення біомаси ГК концентрується і проходить перший етап очищення, спрямований на видалення домішок, серед яких можуть бути білки до 0,1%. Бактеріальні білки мають відмінну природу від білків організму людини, тому невідповідна чистота продукту може становити ризик для здоров'я при використанні ін'єкцій.

Далі проводиться додаткове доочищення для усунення залишкових домішок і досягнення високої чистоти кінцевого продукту. Це необхідно, оскільки ГК застосовується для виробництва ін'єкційного препарату, призначеного для лікування остеоартрозу. Як сорбенти для очищення використовують різні матеріали, але для їхнього усунення з ГК потрібен процес ультрафільтрації за допомогою мембран із точним діаметром пор.

Кінцевий продукт — сіль натрій гіалуронату — утворюється шляхом додавання 0,9% розчину хлориду натрію. Ця форма має істотну перевагу завдяки меншому розміру молекул, які легко проникають у тканини організму і забезпечують широкий спектр позитивних впливів. Зменшення розміру молекул відбувається через процес гідролізу, під час якого відокремлюються протеїни, жири і кислоти.

При фізіологічному значенні рН молекули ГК набувають негативного заряду і формують гідрофільні солі, надаючи речовині властивості утворювати з водою стабільний розчин. Водночас ГК є чутливою до змін рН: в умовах нижче 4 або вище 11 вона розкладається через гідроліз.

При процесі гідролізу руйнуються водневі зв'язки і гідрофобні взаємодії; це призводить до зниження в'язкості ланцюгів полімеру. Однак ці зміни є тимчасовими й оборотними.

Така реологічна поведінка робить натрій гіалуронат незамінним у сфері медицини, фармацевтики, косметології та виробництві харчової продукції. Ця форма найбільш поширена на ринку завдяки зручності у виробництві лікарських засобів і мінімізації пошкодження властивостей під час роботи з

матеріалом [37].

Важливо зазначити, що ГК є термолабільною речовиною. Сушіння проводиться при низьких температурах, що дозволяє отримати якісний кінцевий продукт. Висушений матеріал у вигляді коржів подрібнюють і просіюють. Отриманий натрій гіалуронат зберігають у герметичних упаковках у сухому місці за температури не вище 25 °С.

Після завершення технологічного процесу на заключних етапах отримується білий порошок солі натрій гіалуронату. Основні етапи виробничого процесу включають:

1. Зберігання культуральної рідини.
2. Руйнування капсул клітин термічним методом.
3. Відокремлення біомаси (сепарація).
4. Ультрафільтрація для усунення залишків домішок.
5. Додаткове очищення за допомогою сорбентів.
6. Проведення ультрафільтрації для усунення сорбенту.
7. Формування натрій гіалуронату за допомогою NaCl.
8. Висушування солі гіалуронату натрію.
9. Подрібнення матеріалу до порошкоподібного стану.
10. Просіювання отриманого порошку.
11. Фасування, пакування, маркування та відвантаження продукту.

Підбір методу для відокремлення біомаси і підготовка обладнання.

Для виділення гіалуронової кислоти з бактеріальних капсул *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 необхідно спершу провести обробку клітин. Цей процес може виконуватись такими методами:

- Нагрівання до 70 °С протягом 1 години.
- Підкислення за допомогою 3-хлороцтової кислоти.

Нагрівання вважається більш простим і економічно ефективним методом, оскільки не потребує значних витрат на реагенти, а час витримки становить лише 1 годину. Натомість використання 3-хлороцтової кислоти є

дорожчим і супроводжується труднощами утилізації токсичних відходів, адже ця кислота має високий рівень токсичності (4 ступінь).

Таким чином, обраний метод – нагрів ферментаційної суміші до 70 °С із подальшим охолодженням до кімнатної температури, що триває 5 годин. Під дією температури оболонка бактеріальних капсул руйнується, оскільки *Streptococcus zooepidemicus* не витримує температуру понад 45 °С.

Відокремлення біомаси. На цьому етапі передбачено видалення клітин-продуцентів за допомогою фільтрування, центрифугування чи сепарування. Особливість біомаси *Streptococcus zooepidemicus* полягає у її високій в'язкості та взаємодії зі сполуками гіалуронової кислоти, що змінює реологічні властивості середовища під хімічним впливом.

Методи обробки:

1. Фільтрація. Цей процес базується на проходженні суспензії крізь мембрану під впливом різниці тисків по її обидва боки. Проте висока в'язкість суміші та велика кількість домішок створюють певні труднощі при застосуванні вакуум-фільтрів. Необхідною умовою є попередня коагуляція частинок для їх легшого фільтрування, однак це може негативно вплинути на реологічні характеристики гіалуронової кислоти. Фільтрація без попередньої обробки є нерентабельною через складність процесу.

2. Сепарування. Цей метод розділення базується на різниці густини фаз у системі та показав свою ефективність для роботи із змішаними об'ємами суспензій та емульсій. Сепарування не спричиняє фізичних чи хімічних змін у структурі гіалуронової кислоти. Переваги методу включають:

- Менші втрати культуральної рідини порівняно з фільтруванням.
- Автоматизація процесу.
- Високий коефіцієнт розділення навіть у високодисперсних системах.

3. Центрифугування. Процедура базується на осадженні частинок під дією відцентрової сили та схожа за характеристиками із сепаруванням. Проте коефіцієнт розділення є нижчим, а вартість експлуатації вища через енерговитрати й потребу в регулярному технічному обслуговуванні. До того ж

робота центрифуг обмежена концентрацією дисперсної фази щонайменше 5–10 %, тоді як вміст біомаси у культуральному середовищі зазвичай становить не більше 4 %.

Для процесу відділення біомаси пропонується використання сепаратора ALFA LAVAL BTAX 215, спеціально розробленого для біотехнологічних процесів, таких як збір клітин, очищення поживних середовищ та відділення клітинного детриту. Цей апарат відрізняється високою ефективністю сепарації та сумісністю із замкнутими системами.

Очищення цільового продукту. Враховуючи, що гіалуронова кислота використовується у виробництві ін'єкційних препаратів, її очищення від домішок є обов'язковим етапом. До основних домішок належать білки і залишки клітин бактерій. Необхідність вилучення білків визначається кількома причинами:

- Білки можуть залишатися лише як залишок поживного середовища.
- Вони здатні осідати разом із гіалуроновою кислотою, перешкоджаючи її очищенню на наступних стадіях.
- Для забезпечення високої чистоти кінцевого ін'єкційного продукту. Після руйнування клітинних капсул білкові молекули також можуть потрапляти в сировину. Бактеріальні білки мають відмінну природу від людських, і їх залишковий вміст у препараті може призвести до небезпечних реакцій в організмі.

Для очищення від білків та інших високомолекулярних домішок обирається ультрафільтраційна установка. Відповідно до методичних рекомендацій, мембрану для установки підбирають з урахуванням розміру молекул натрій-гіалуронату (26,45 нм або 0,03 мкм). У науковій літературі також обговорюється використання мембран із діаметром пор 0,45 мкм. Таким чином, високомолекулярні домішки залишаються на поверхні мембрани, тоді як гіалуронова кислота проходить крізь неї.

Переваги ультрафільтрації:

- Висока ефективність.

- Низький тиск під час роботи.
- Тривалий термін служби мембран.
- Компактність обладнання порівняно з традиційними схемами.
- Повнність автоматизований процес.

Недоліки:

- Треба регулярно промивати.
- Дороговартісне обладнання.

Літературними даними означено, що після такого очищення вміст залишкових білків становить 1.181 ± 0.142 мг/л [38].

Адсорбційне очищення. Для подальшого очищення та видалення залишкових домішок до гіалуронової кислоти додають сорбент, щоб провести процес адсорбції. Цей етап забезпечує кінцеву чистоту продукту. Як сорбенти можуть бути використані: оксид алюмінію або активоване вугілля.

Відповідно до літературних даних, обидва сорбенти мають високу ефективність. Проте активоване вугілля забезпечує більший рівень очищення — 97,4% порівняно з оксидом алюмінію (87,8%) [39].

Активоване вугілля відмінно адсорбує органічні речовини, високомолекулярні сполуки та речовини з неполярною структурою. Після додавання сорбенту розчин перемішують та відстоюють протягом однієї години.

Для видалення залишків активованого вугілля можуть бути повторно застосовані методи ультрафільтрації з мембраною діаметром пор 300 кДа.

Завершальна обробка. До очищеної гіалуронової кислоти додають 0,15 М розчин натрій хлориду. Це сприяє реакції заміщення, внаслідок чого формується натрій гіалуронат. Даний етап дозволяє зменшити в'язкість розчину і одержати форму, придатну для подальшого виробництва ін'єкційного препарату.

Вибір методу сушіння. Гіалуронова кислота є термолабільним продуктом, що обмежує використання методів сушіння за температур понад 80 градусів. Високі температури призводять до змін у молекулярній структурі,

що впливає на її фізичні властивості. Реологічні характеристики також залежать від стабільності молекулярної структури цільового продукту.

Серед можливих способів сушіння можна виділити сублімаційне (ліофільне) сушіння та вакуумне.

Вакуумна сушильна шафа працює із періодичним циклом і має герметично закритий корпус циліндричної або прямокутної форми. Для збереження тепла її корпус і кришка теплоізолювані. При сушінні теплоносії подається до плит, що дозволяє нагрівати матеріал, розміщений на полицях, і сприяє випаровуванню вологи. Для зменшення температури процес ведеться під вакуумом, а пара вологи відводиться у конденсатор. У разі потреби шар матеріалу періодично перемішують.

Переваги вакуумного сушіння включають можливість роботи з матеріалами при низьких температурах, економію енергоресурсів, утримання парів цінних речовин (наприклад, спиртів чи органічних рідин), а також поліпшені умови роботи персоналу з точки зору безпеки та санітарних норм. Однак недоліками таких сушарок є низька продуктивність, високі затрати часу на процеси сушіння, завантаження і вивантаження матеріалу, а також часткове залучення ручної праці.

Сублімаційне сушіння застосовується для зневоднення біологічно активних мікроорганізмів, ферментів та інших термолабільних продуктів. Його принцип базується на випаровуванні води без переходу у рідкий агрегатний стан. Тепло надходить до матеріалу через контакт із нагрітою поверхнею або радіаційним шляхом.

Для сушіння солі натрій гіалуронату обрано вакуумну сушарку, оскільки вона добре підходить для невеликих обсягів вологого матеріалу, наприклад, 15,7 кг. На наступному етапі технологічного процесу передбачено подрібнення висушеного продукту. Після сушіння матеріал приймає вигляд сухих коржів, які потребують подрібнення для подальшого фасування у необхідних об'ємах. Розмір кристалів натрій гіалуронату після подрібнення становить 10 мкм.

Для цієї задачі буде використано валкову зубчасту дробарку. Такі пристрої ефективно подрібнюють крихкі матеріали середньої твердості (наприклад, сіль чи вугілля) шляхом роздавлювання та розколювання. Зубчасті валки працюють із швидкістю 1–1,5 м/с. Привід провідного валка здійснюється через пасові шківни та зубчасту передачу, яка передає рух і на інші валки.

Зубчаста дробарка обладнана повільнообертальними зубчастими валками, які рухаються з однаковою швидкістю (1-1,5 м/с). Ведучий валок приводиться в дію пасовими шківнами за допомогою зубчастої передачі, після чого рух передається основному валку. Основними перевагами цього типу дробарок є простота конструкції, легкість ремонту та обслуговування, знижена кількість пилу, а також менше споживання електроенергії порівняно з іншими типами дробарок.

3.4. Підбір технологічного обладнання для післяферментаційних етапів із врахуванням матеріальних потоків за стадіями

Технологічне обладнання підібрано відповідно до потреб процесу і представлено в додатку А. Вихідні дані такі: об'єм культуральної рідини в один цикл ферментації становить $V_{кр} = 3 \text{ м}^3$, концентрація продукту у культуральній рідині – Сант = 5 г/л (що дорівнює 5 кг/м³), концентрація біомаси в КР – СБМ = 4,6 г/л (або 4,6 кг/м³). Втрати на етапах виділення цільового продукту становлять 38,0%. Початкова маса цільового продукту, що надходить із культуральної рідини, становить 15 кг ($3 \text{ м}^3 \times 5 \text{ кг/м}^3$). З урахуванням втрат кінцевий вихід має бути 9,3 кг.

3.5. Контроль виробничого процесу

У процесі промислового виробництва гіалуронової кислоти проводиться контроль підготовки аераційного повітря та титрувальних агентів, здійснюється періодичний відбір проб для мікробіологічного аналізу живильного середовища, посівного матеріалу та культуральної рідини під час

біосинтезу. Також контролюються показники росту і синтезу, зокрема концентрація гіалуронової кислоти, біомаси та компонентів джерел вуглецю й азоту.

ВИСНОВКИ ТА ПРОПОЗИЦІЇ

1. Гіалуронова кислота відіграє важливу роль у нормальному функціонуванні організму. Проте після 30 років самостійне вироблення цієї речовини організмом стає недостатнім, що може призводити до дистрофічних змін у внутрішніх органах.

2. Орієнтовна річна потреба населення України в гіалуроновій кислоті становить 1 755 600 мг. Для забезпечення такого обсягу за допомогою *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 потрібно 572,774 л культуральної рідини для виробництва 1755,6 г продукту.

3. Відповідно до обчислень визначено необхідний об'єм ферментатора – 6,3 м³.

4. Для виділення гіалуронової кислоти із ферментаційної суміші використовується чотирьохкубовий збірник. Оптимальні умови зберігання у ньому – температура 20±5°C та pH 7,0.

5. Як найефективніше рішення для виділення гіалуронової кислоти рекомендовано сепаратор ALFA LAVAL BTAX 215, що працює в замкнених системах і має високу ефективність.

6. Активоване вугілля обране як адсорбент для очищення продукту від домішок.

7. Для сушки продукту рекомендовано вакуумну сушарку, яка підходить для сушки невеликих обсягів матеріалу (до 15 кг). У висушеному вигляді отримані коржі подрібнюються зубчастою дробаркою.

ПРОПОЗИЦІЯ

Можливість використати наші розрахунки та підбір обладнання для оптимізації технології виробництва гіалуронової кислоти у виробництві.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Лікування пацієнтів з остеоартрозом колінних, кульшових та кистьових суглобів [Електроний ресурс] Режим доступу: <https://health-ua.com/article/61426-lkuvannya-patentv-zosteoartrozom--kolnnih-kulshovih-takistovih-suglobv>
2. Kalyagin A.N, Anoshenkova O.N, Antipova O.V. Hyaluronic acid formulations in osteoarthritis: Possibilities for import substitution. Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya. Rheumatology Science and Practice. 2016;54(5):601-606 (In Russ.). doi: <http://dx.doi.org/10.14412/1995-4484-2016-601-606>
3. Petr Snetkov, Kseniia Zakharova, Svetlana Morozkina. Hyaluronic Acid: The Influence of Molecular Weight on Structural, Physical, Physico-Chemical, and Degradable Properties of Biopolymer. Polymers (Basel). 2020 Aug; 12(8): 1800. doi: 10.3390/polym12081800
4. Pat. WO 2012/032154 A1. Process for the production of hyaluronic acid in Escherichia coli or Bacillus subtilis // Corsa V., Negro A., Vaccaro S., Messina L. Publ. 15.03.2015.
5. Pan N., Vignoli J., Baldo C. Effect of fermentation conditions on the production of hyaluronic acid by Streptococcus zooepidemicus ATCC 39920. Acta Scientiarum. ISSN printed: 1679-9283. Doi: 10.4025/actascibiolsci.v37i4.28176
6. Li, Y., Li, G., Zhao, X., Shao, Y., Wu, M., & Ma, T. (2019). Regulation of hyaluronic acid molecular weight and titer by temperature in engineered Bacillus subtilis. 3 Biotech, 9(6). doi:10.1007/s13205-019-1749-x
7. Ji Eun Woo, Hyeon Jeong Seong. Metabolic Engineering of Escherichia coli for the Production of Hyaluronic Acid From Glucose and Galactose. Front Bioeng Biotechnol. 2019; 7: 351. Doi: 10.3389/fbioe.2019.00351
8. Pan, N. C., Vignoli, J. A. Effect of fermentation conditions on the production of hyaluronic acid by Streptococcus zooepidemicus ATCC 39920. Acta Scientiarum. Biological Sciences, 37(4), 411 (2015)

doi:10.4025/actascibiolsci.v37i4.28176

9. Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus. VetBact Swedish/svenska Veterinary bacteriology: information about important bacteria [Електроний ресурс] Режим доступу: <https://www.vetbact.org/?artid=15>

10. Hélder Pereira, Duarte Andre Sousa, António Cunha, Renato Andrade, J. Espregueira-Mendes, J. Miguel Oliveira, and Rui L. Reis. Hyaluronic Acid. Adv Exp Med Biol 2018;1059:137-153. doi: 10.1007/978-3-319-76735-2_6.

11. Остеоартроз. Клінічна настанова. Державний експертний центр МОЗ України. Асоціація ревматологів України. Асоціація ортопедів-травматологів України 2017.

12. Суплазин 1-Shot раствор д/ин. 60 мг/6 мл по 6 мл №1. зе [Електронний ресурс] Режим доступу:

<https://tabletki.ua/%D0%A1%D1%83%D0%BF%D0%BB%D0%B0%D0%B7%D0%B8%D0%BD-1-shot/1015761/>

13. Сертобек ПРО [Електроний ресурс] Режим доступу:

<https://tabletki.ua/uk/%D0%A1%D0%B5%D1%80%D1%82%D0%BE%D0%B1%D0%B5%D0%BA%D0%BF%D1%80%D0%BE/1015818/pharmacy/kiev/>

14. Ферматрон плюс [Електроний ресурс] Режим доступу:

<https://artromed.zakupka.com/p/573480956-fermatron-plyus-fermathron-2-ml-1/>

15. Остеніл плюс [Електроний ресурс] Режим доступу:

<https://artromed.zakupka.com/p/185799730-ostenil-plyus-ostenil-plus/>

16. Xuzhen Zhang, Man Wang, Tuanjie Li, Lixia Fu, Wei Cao, and Hao Liu. Construction of efficient Streptococcus zooepidemicus strains for hyalurononic acid production based on identification of key genes involved in sucrose metabolism. AMB Express. 2016; 6: 121, doi: [10.1186/s13568-016-0296-7](https://doi.org/10.1186/s13568-016-0296-7)

17. Long Liu, Yanfeng Liu, Jianghua Li. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. Microbial Cell Factories volume 10, 2011

18. Chong FB, Blank LM, Mclaughlin R, Nielsen LK: Microbial hyaluronic acid production. Appl Microbiol Biotechnol. 2005, 66: 341-351.

10.1007/s00253-
004-1774-4

19. Stanislav Sokolenko, Marco Quattrociochi. Identifying model error in metabolic flux analysis – a generalized least squares approach. BMC Syst Biol. 2016, doi: 10.1186/s12918-016-0335-7

20. Pires AMB, Santana MH: Metabolic effects of the initial glucose concentration on microbial production of hyaluronic acid. Appl Biochem Biotechnol. 2010, 162: 1751-1761. 10.1007/s12010-010-8956-6

21. Промышленный ферментер 1000л. Biorus Электронный ресурс [Режим доступа] <https://bio-rus.ru/primeryi-speczifikaczij/promyishlennyij-fermenter-biorus-1000-l-dlya-veterinarii.html>

22. Adriano H. Oliveira¹, Cristiane C. Ogrodowski. Cashew apple juice as microbial cultivation medium for non-immunogenic hyaluronic acid production Brazilian Journal of Microbiology 44, 4, 1097-1104 (2013) <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822014005000017>

23. Карлаш Ю.В., Омельчук Є.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв. [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання/ Ю.В. Карлаш, Є.С. Омельчук К: НУХТ, 2019. 252 с.

24. Порядок організації роботи з державної реєстрації (перереєстрації) дезінфекційних засобів та ведення Державного реєстру дезінфекційних засобів [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://moz.gov.ua/uploads/3/18681-pro_20200206_1_dod.pdf

25. Сучасні дезінфікуючі засоби та їх застосування в медицині [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.medsprava.com.ua/article/413-qqq-16-suchasn-deznfkuyuch-zasobi-ta-h-zastosuvannya-v-meditsin>

26. Дезекон. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://interdez.com.ua/product/dezinficiruyuschee-sredstvo-desekon-om->

27. Державна Санітарно-Епідеміологічна Служба України. Методичні вказівки щодо застосування засобу «Хлорантоїн» з метою дезинфекції об'єктів та достерилізаційного очищення виробів медичного призначення., Київ, 2013р.
28. Еклін Н [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://prom.ua/p1148177497-nejtralnoe-moyuschee-sredstvo.html>
29. Arianna Fallacara, Erika Baldini, Stefano Manfredini. Hyaluronic Acid in the Third Millennium. *Polymers (Basel)*. 2018 Jul; 10(7): 701. Published online 2018 Jun 25. doi: 10.3390/polym10070701
30. K. Jagadeeswara Reddy K.T. Karunakaran Purification and characterization of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus* strain 3523-7 Jagadeeswara Reddy & Karunakaran J. *BioSci. Biotech*. 2013, 2(3): 173-179.
31. Sungchul Choi, Woncheol Choi. Purification and biocompatibility of fermented hyaluronic acid for its applications to biomaterials *Biomater Res*. 2014; 18: 6. Published online 2014 Jun 13. doi: 10.1186/2055-7124-18-6
32. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. К.: НУХТ, 2019. 252 с.
33. Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Малашенко Ю.Р., Пинчук Г.Э. Микробный синтез экзополисахаридов на С1–С2–соединениях. К.: Наук. думка, 1992. 212 с.
34. Morag R. Graham, Laura M. Smoot. Virulence control in group A *Streptococcus* by a two-component gene regulatory system: Global expression profiling and in vivo infection modeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Oct 15; 99(21): 13855–13860. doi: 10.1073/pnas.202353699
35. B. F. Chong, L. Blank, Microbial hyaluronic acid production. Corpus ID: 19486509. DOI:10.1007/s00253-004-1774-4. doi:10.1007/s00253-004-1774-4

36. Загальна біотехнологія: Лабораторний практикум для студ. напряму 6.051401 "Біотехнологія" ден. та заоч. форм навч. / Уклад.: Ю.М. Пенчук, С.О. Старовойтова, В.О. Красінько. К.: НУХТ, 2010. 71 с.
37. Giuseppina Paola Parpinello and Andrea Versari. A Simple High-Performance Liquid Chromatography Method for the Analysis of Glucose, Glycerol, and Methanol in a Bioprocess. Dipartimento di Biotecnologie Agrarie ed Ambientali, Università di Ancona, Via Brece Bianche, 60130 Ancona, Italy
38. K. Jagadeeswara Reddy K.T. Karunakaran Purification and characterization of hyaluronic acid produced by Streptococcus zooepidemicus strain 3523-7 Jagadeeswara Reddy & Karunakaran J. BioSci. Biotech. 2013, 2(3): 173-179.
39. Вимірювання в'язкості гіалуроната натрію відповідно до Європейської Фармакопеї [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://paar.ru/upload/iblock/ed2/ed251a0f4a429a02169ebf8292fff55d.pdf>
40. Аналізатор вологості <http://metrinco.com/uk/analizatory-volohosti/laboratornyi-analizator-volohosti-metrinco-m100ma>
41. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. Доповнення 2. Харків: Державне підприємство «Науковоекспертний фармакопейний центр», 2008. 620 с. ISBN 966-96478-1-9
42. Ельперін, І.В. Автоматизація виробничих процесів: підруч. / І.В.Ельперін, О.М.Пупена, В.М.Сідлецький, С.М.Швед Вид. 2-ге, виправлене К.: Вид. Ліра-К, 2015. 320 с.
43. Локальна споруда «ДЖЕРЕЛЮ» [Електронний ресурс]: <https://ecology.com.ua/ru/products/localni-ochistitelnye-sooruzheniya-dgerelo/>
44. Шестопалов О. В., Пітак І. В. Аналіз існуючих процесів та апаратів біологічної очистки газових викидів. Процеси та обладнання. № 3/5(17), 2014.