

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

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему: «ОРГАНІЗАЦІЯ ВИРОБНИЦТВА ГІАЛУРОНОВОЇ
КИСЛОТИ»

Виконав : здобувачка вищої освіти групи БТ621(3,10д)-01
спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія
освітньої програми Біотехнологія
Анастасія РЯДНИХ

Керівник: Асистент кафедри біотехнології,
доктор філософії Аліна СОЛОВЙОВА

Рецензент: Начальник відділу фармацевтичної розробки
ТОВ «БІОЛІК ФАРМА», к.фарм.н., с.н.с.
Олена НАЗАРОВА

АНОТАЦІЯ

Кваліфікаційна робота присвячена організації виробництва продукту «Кислота гіалуронова високомолекулярна мікробного походження» на вітчизняному підприємстві. У роботі складено опис технологічного процесу отримання кислоти гіалуронової мікробним синтезом, складено біологічну, технологічну та апаратурну схеми виробництва. Як основний апарат розглянуто ультрафільтраційну установка марки UF 0,2. Робота складається з вступу, чотирьох розділів, графічних матеріалів, висновків, списку літератури з 30 джерел та додатків. Загальний обсяг роботи становить 70 сторінок, містить 9 рисунків, 7 таблиць та 2 креслення формату А1.

Ключові слова: кислота гіалуронова, *Corynebacterium glutamicum*, біосинтез, ультрафільтрація, ферментер.

ANNOTATION

The qualification work is devoted to the organization of production of the product “High-molecular hyaluronic acid of microbial origin” at a domestic enterprise. The work describes the technological process of obtaining hyaluronic acid by microbial synthesis, and a biological, technological and hardware production scheme is compiled. The main device is an ultrafiltration unit of the UF 0.2 brand. The work consists of an introduction, four sections, graphic materials, conclusions, a list of references from 30 sources and appendices. The qualification work consists of an introduction, four chapters, graphical materials, a conclusion, a list of used literature from 30 items and appendices. The total volume of work is 70 pages, 9 figures, 7 tables, 2 A1 format drawings.

Key words: hyaluronic acid, *Corynebacterium glutamicum*, biosynthesis, ultrafiltration, fermenter.

ЗМІСТ

Вступ.....	4
1 Аналітичний огляд.....	6
2 Характеристика готового продукту, сировини, матеріалів, напівпродуктів.....	16
2.1 Характеристика готового продукту.....	16
2.2 Характеристика сировини, матеріалів, напівпродуктів	17
2.3 Характеристика біологічного об'єкту.....	20
2.4 Біосинтез цільового продукту.....	23
3 Технологічна частина.....	27
3.1 Розрахунок матеріального балансу.....	27
3.2 Розрахунок і вибір технологічного обладнання (із кресленням основного апарату).....	32
3.3 Опис технологічного процесу.....	39
3.4 Схеми виробництва (зі специфікацією обладнання).....	50
3.5 Критичні параметри виробництва.....	59
3.6 Екологічні аспекти виробництва.....	62
Висновок.....	66
Список використаної літератури.....	67
Додатки.....	71

					162.01.17.00 000 ПЗ			
Змн..	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Рядних А.С.			Організація виробництва гіалуринової кислоти Пояснювальна записка	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевірив		Соловйова А.В.					1	70
.						НФаУ Кафедра біотехнології		
Н. контр.								
Затвердив		Хохленкова Н.В.						

ВСТУП

Актуальність теми. Мікробне виробництво гіалуронової кислоти (ГК) є областю досліджень, яка привертає увагу в останні роки через зростання попиту на цей біополімер в різних галузях промисловості, в фармацевтиці та медицині. ГК за структурою відноситься до глікозаміногліканів лінійної форми, нессульфатованих. Це природний біополімер, який складається з повторюваних одиниць N-ацетилглюкозаміну та глюкуронової кислоти. ГК відіграє важливу роль у живих організмах і є перспективним біоматеріалом для різних застосувань завдяки своїм властивостям, як здатність утримувати зволоження, в'язкопружність, стійкість до механічних пошкоджень, відсутність імуногенності та токсичності. Тому організація промислового виробництва цієї сполуки є перспективним напрямом вітчизняної біотехнології, тому що саме мікробне виробництво гіалуронової кислоти є областю досліджень, яка привертає увагу в останні роки.

Мета роботи полягає в організації виробництва високомолекулярної гіалуронової кислоти мікробним синтезом на вітчизняному підприємстві для забезпечення продуктом високої якості косметичну, фармацевтичну, харчову та інші галузі.

Для досягнення мети були визначені завдання:

- провести огляд напрямів застосування гіалуронової кислоти та джерел її отримання;
- проаналізувати матеріали зарубіжних та вітчизняних наукових публікацій, що стосуються методів отримання глікозаміногліканів (зокрема ГК) мікробним синтезом та їх оптимізації;
- з'ясувати коло перспективних продуцентів глютамінової кислоти та зробити вибір для його використання в технологічному процесі;
- дослідити особливості культивування продуценту та асортимент живильних середовищ для його промислового культивування;

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
						4
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

- проаналізувати технологічне обладнання для організації мікробного синтезу на виробничих потужностях одного вітчизняних підприємств, обґрунтувати вибір апаратів;

- провести технологічні розрахунки щодо сировини та обладнання для технологічного процесу отримання серії кислоти гіалуронової високомолекулярної.

Об'єктами роботи є високопродуктивний штам *Corynebacterium glutamicum*, кислота гіалуронова високомолекулярна.

Предметом роботи є технології культивування *C. glutamicum*, технології виділення та очистки гіалуронової кислоти, обладнання для організації виробничого процесу її отримання.

Методи досліджень: скринінг матеріалів зарубіжних та вітчизняних наукових публікацій, узагальнення інформації, технологічні методи - розрахункові, графічні, описові.

Практичне значення отриманих результатів. Робота має значний практичний вплив на вітчизняну біотехнологію завдяки розробці пропозицій для виробництва високомолекулярної ГК мікробним синтезом із *Corynebacterium glutamicum*. Це дозволяє організувати ефективне біотехнологічне виробництво з обґрунтованою технологією культивування та підбором обладнання, забезпечити високоякісну ГК для косметики, фармацевтики та харчової галузі, задовольняючи зростаючий попит, створює основу для подальших досліджень, сприяє інноваційному розвитку підприємств, підвищуючи їх конкурентоспроможність.

За темою роботи опубліковано тези:

Рядних А.С. Альтернативні субстрати для виробництва гіалуронової кислоти мікробним синтезом / Рядних А.С., наук. кер.: Двінських Н.В. // Актуальні питання створення нових лікарських засобів: мат. XXXI міжнар. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів (23-25 квітня 2025 р., м. Харків). – Харків: НФаУ, 2025. – С. 188-189.

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
						5
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

1 АНАЛІТИЧНИЙ ОГЛЯД

1.1 Значення для організму та напрями застосування гіалуронової кислоти

Останніми роками зростає попит на гіалуронову кислоту для фармацевтичних, косметичних і харчових застосувань. [1, 2]

Гіалуронові кислота (ГК) — це природний лінійний полісахарид класу глікозаміногліканів, який складається з повторюваних дисахаридних ланок D-глюкуронової кислоти та N-ацетил-D-глюкозаміну (рис. 1.1). Вона є одним із головних компонентів позаклітинного матриксу сполучної, епітеліальної та нервової тканин, входить до складу синовіальної рідини, склоподібного тіла ока, шкіри, хрящів, пуповини та багатьох інших біологічних структур. [19, 25]

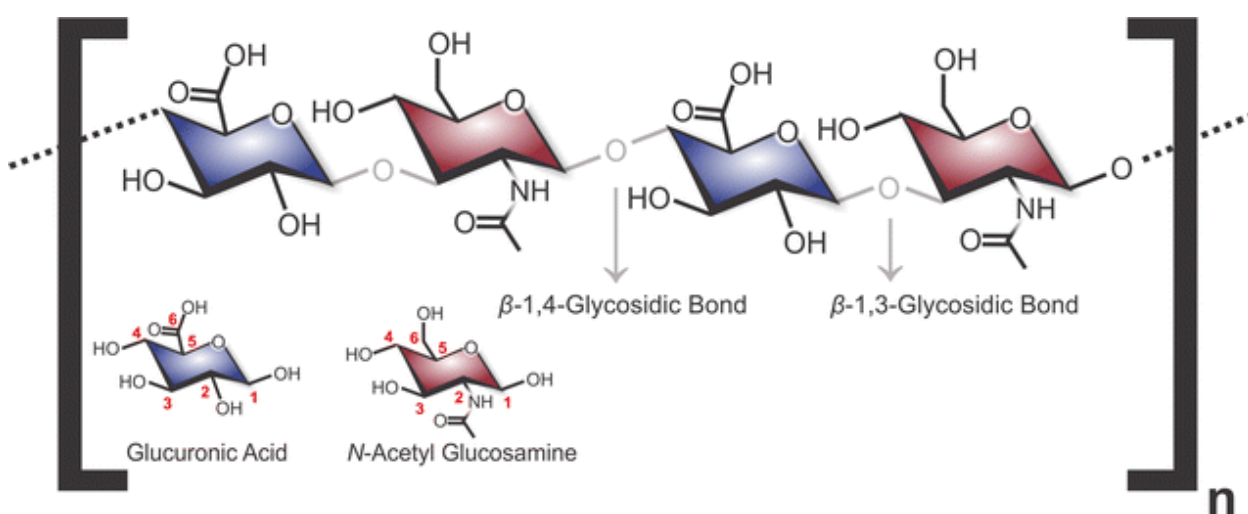


Рис. 1.2 - Молекулярна структура повторюваних дисахаридних одиниць, що складаються з N-ацетилглюкозаміну та глюкуронової кислоти, що призводить до утворення гіалуронової кислоти (ГА). [12]

Основна фізіологічна функція ГК полягає у забезпеченні гідратації тканин завдяки здатності зв'язувати і утримувати воду — одна молекула ГК

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		6

може утримувати до 1000 разів більше води, ніж її власна маса. Це забезпечує еластичність, пружність і тургор шкіри, амортизацію суглобів, а також оптимальні умови для дифузії поживних речовин і метаболітів. ГК бере участь у процесах регенерації тканин, загоєнні ран, міграції та проліферації клітин, модулює запальні реакції, впливає на ангиогенез і імунну відповідь. [12, 20, 25]

З віком або під впливом несприятливих факторів (ультрафіолет, оксидативний стрес, хронічні захворювання) вміст ГК у тканинах знижується, що призводить до втрати еластичності шкіри, появи зморшок, зниження змащувальних властивостей синовіальної рідини, розвитку остеоартриту та інших дегенеративних змін [12, 25].

Медичні застосування ГК

1. Ортопедія та ревматологія. ГК використовується для лікування остеоартриту шляхом внутрішньосуглобового введення (віскосуплементация). Препарати ГК відновлюють в'язкість і еластичність синовіальної рідини, зменшують біль, покращують рухливість суглобів, стимулюють відновлення хрящової тканини та знижують потребу у нестероїдних протизапальних засобах.

2. Офтальмологія. ГК входить до складу штучних сліз, розчинів для зволоження рогівки та препаратів для в'язкоеластичної підтримки тканин під час офтальмохірургії¹. Вона сприяє регенерації епітелію, захищає очну поверхню, зменшує подразнення та сухість очей.

3. Хірургія та регенеративна медицина. ГК застосовується для прискорення загоєння ран, опіків, виразок, у складі гелів, плівок, пов'язок. Її біосумісність і здатність стимулювати міграцію клітин роблять її перспективною для тканинної інженерії, створення біоматеріалів для імплантації, тривимірних матриць для росту клітин.

4. Дерматологія та косметологія. Гіалуронова кислота — ключовий компонент ін'єкційних філерів для корекції зморшок, збільшення об'єму губ, контурної пластики обличчя. Вона також входить до складу кремів,

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		7

сироваток, масок для зволоження шкіри, підвищення її пружності та захисту від старіння. ГК у косметичних засобах діє як потужний гідратант, формуючи захисну плівку на поверхні шкіри, зменшуючи трансепідермальні втрати води.

5. Урологія та гінекологія. ГК використовується у складі препаратів для лікування інтерстиціального циститу, вагінальної сухості, післяопераційної реабілітації слизових оболонок. [7, 12, 17, 25].

На рис. 1.2 наведено наочне зображення напрямів застосування гіалуронової кислоти в медицині.

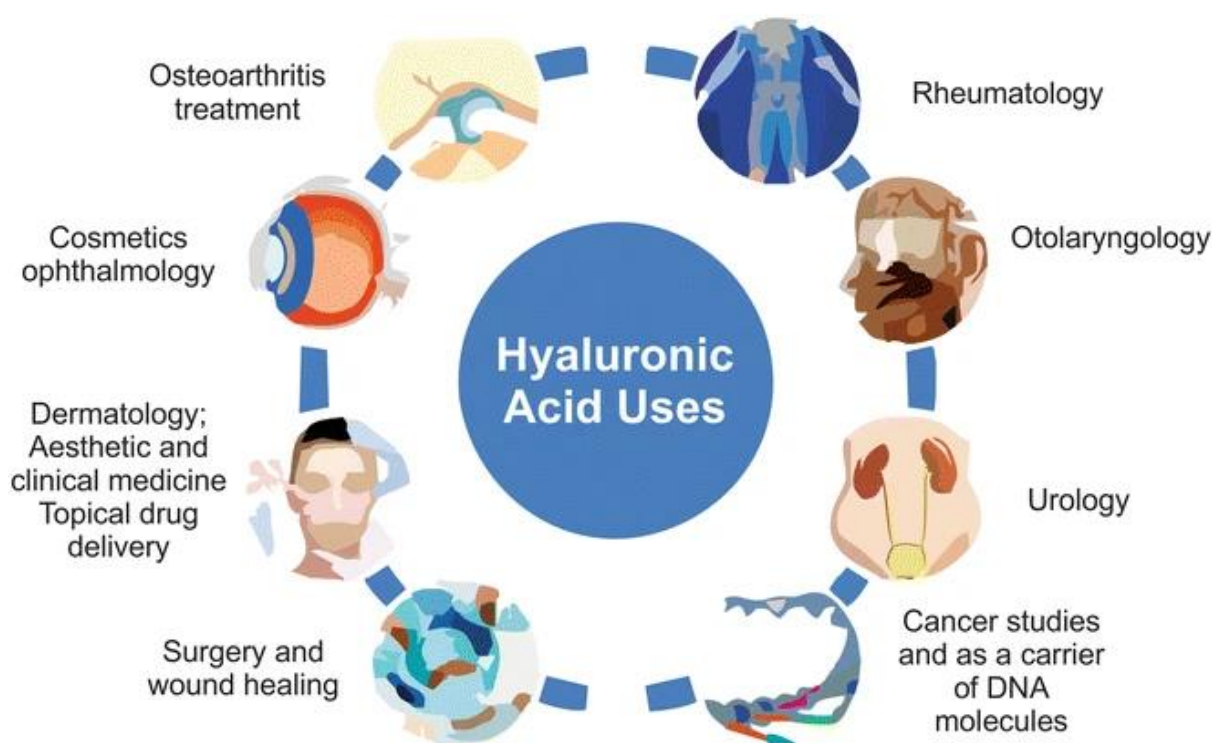


Рис. 1.2 Біомедичне застосування гіалуронової кислоти. [7].

Фармацевтичні застосування ГК

Гіалуронова кислота застосовується як допоміжна речовина у складі лікарських форм — гелів, мазей, супозиторіїв, ін'єкційних розчинів, що забезпечують пролонговану дію активних компонентів, підвищують біодоступність, покращують реологічні властивості препаратів. [7, 12, 24, 25].

Застосування в харчовій промисловості.

ГК використовується як функціональний інгредієнт у дієтичних добавках, напоях, продуктах для підтримки здоров'я суглобів, шкіри,

волосся. Її безпечність і біодоступність підтверджені численними дослідженнями, а застосування у харчових продуктах регламентується стандартами якості та безпеки (ДСТУ ISO 22000:2019). [7, 12, 22, 25].

Застосування в ветеринарії

Гіалуронова кислота застосовується для лікування захворювань суглобів у коней, собак, котів, а також для прискорення загоєння ран у ветеринарній практиці. [7, 12, 25].

Застосування у косметичі

У косметичі використовують як високомолекулярну, так і низькомолекулярну гіалуронову кислоту — кожна з них має свої властивості й переваги:

- **Високомолекулярна гіалуронова кислота** (800 – 2 250 кДа) залишається на поверхні шкіри, утворює захисну зволожувальну плівку, зменшує втрату вологи, забезпечує миттєвий ефект зволоження, розгладжує і захищає шкіру від зовнішніх факторів, але не проникає глибоко.
- **Низькомолекулярна гіалуронова кислота** (20 – 300 кДа, особливо 50 кДа) здатна проникати у глибші шари епідермісу, забезпечує глибоке зволоження, стимулює вироблення колагену, підвищує еластичність шкіри та зменшує зморшки, має виражений антивіковий ефект.

Більшість сучасних косметичних засобів містять **комбінацію різних молекулярних фракцій** гіалуронової кислоти для досягнення як поверхневого, так і глибокого зволоження та комплексного anti-age ефекту. [7, 12, 17-20, 25]

Отже, гіалуронова кислота є незамінним компонентом позаклітинного матриксу, який забезпечує гідратацію, еластичність і регенерацію тканин, бере участь у багатьох фізіологічних процесах організму. Завдяки своїм унікальним властивостям вона широко застосовується у медицині, фармації, косметології, харчовій промисловості та ветеринарії. Розвиток біотехнологічного виробництва ГК, зокрема мікробним синтезом,

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		9

забезпечить високу якість, безпеку та доступність цієї сполуки для різних сфер використання.

1.3. Продуценти гіалуронової кислоти.

Промисловий синтез ГК переважно здійснюється мікробіологічними методами, що дозволяє отримувати продукт високої чистоти, біосумісності та безпеки. Нами розглянуто основні групи продуцентів ГК, їхні біотехнологічні особливості, переваги та недоліки, а також сучасні тенденції у виборі мікроорганізмів для промислового виробництва.

1. Класичні продуценти: стрептококи

Історично першими мікроорганізмами для одержання ГК стали β -гемолітичні стрептококи, зокрема *Streptococcus zooepidemicus* та *Streptococcus equi*. Ці бактерії природно синтезують ГК як компонент капсульного полісахариду, що захищає клітину від імунної відповіді хазяїна.

З мікробної точки зору виробництво такого полімеру також є складним завданням через високі витрати на метаболічну енергію. Для утворення димеру ГА необхідні три молекули АТФ, дві молекули УТФ, дві молекули НАД⁺, одна молекула ацетил-КоА та одна молекула глутаміну (враховуючи енергію, витрачену на гліколіз) для синтезу двох попередників ГА (рис. 1.3).

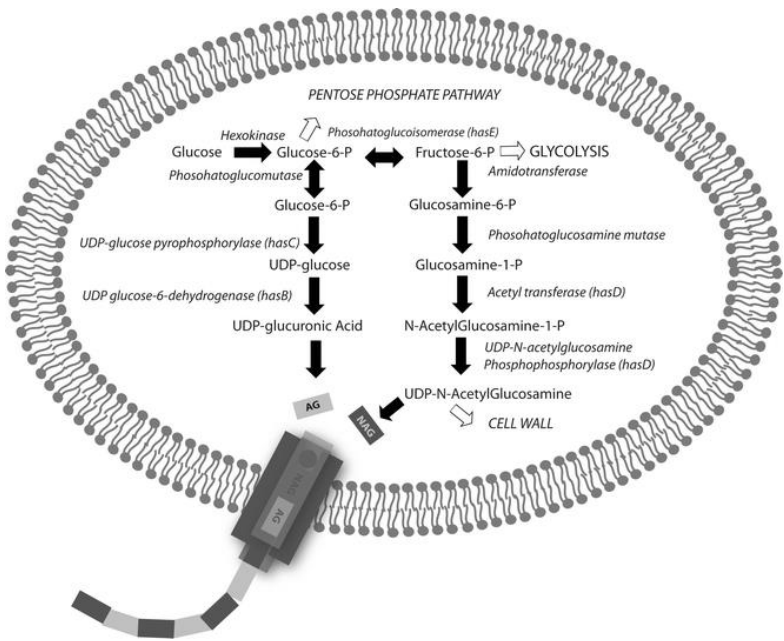


Рис. 1.3. Біосинтетичний шлях гіалуронової кислоти у стрептококів.

Стрептококи здатні продукувати ГК з високою молекулярною масою (до 2–3 МДа) та високим виходом — понад 6–7 г/л у ферментері.

Однак використання стрептококів має суттєві недоліки. По-перше, вони є патогенними для людини, що створює ризики для персоналу та споживачів. По-друге, у культуральній рідині можуть накопичуватися токсини (стрептолізини, гіалуронідази), що ускладнює очистку кінцевого продукту та підвищує вартість виробництва. З огляду на ці обмеження, сучасна біотехнологія активно шукає альтернативні безпечні продуценти. [7, 25]

2. Грампозитивні GRAS-продуценти: *Corynebacterium glutamicum*

Corynebacterium glutamicum — непатогенна бактерія, широко відома як продуцент амінокислот (глутамату, лізину) та визнана безпечною для людини (статус GRAS). Завдяки розвинутим генетичним інструментам і простоті культивування, останніми роками цей мікроорганізм став платформою для гетерологічного синтезу ГК. [1, 2, 4-7, 25]

Генетична інженерія дозволяє інтегрувати в геном *C. glutamicum* гени *hasA*, *hasB*, *hasC*, що кодують ферменти біосинтезу гіалуронової кислоти. Оптимізація метаболічних шляхів, регуляція поглинання глюкози, підвищення аерації та блокування побічних шляхів призводять до отримання високих титрів ГК (до 30–32 г/л) з контрольованою молекулярною масою продукту. Сучасні дослідження демонструють можливість отримання ГК із молекулярною масою понад 1 МДа, що відповідає вимогам фармацевтичної та косметичної промисловості.

Переваги використання *C. glutamicum* включають:

- відсутність патогенності та токсинів,
- простоту масштабування процесу,
- гнучкість у виборі поживних середовищ,
- можливість використання альтернативних субстратів (агровідходи, гліцерин. [1,2, 7, 9-12]

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		11

3. Інші бактеріальні продуценти

Серед інших бактеріальних продуцентів перспективними є *Bacillus subtilis* та *Lactococcus lactis*. Вони також мають статус GRAS, не продукують токсинів і здатні до гетерологічної експресії генів біосинтезу ГК. Наприклад, інженерні штами *B. subtilis* демонструють титри ГК до 7–10 г/л, а *L. lactis* — до 2–3 г/л. Однак для досягнення високої молекулярної маси та продуктивності потрібна подальша оптимізація шляхів метаболізму та умов культивування. [7, 8, 12]

4. Дріжджі та інші еукаріотичні продуценти

Гетерологічний синтез ГК у дріжджах, зокрема *Kluyveromyces lactis* та *Saccharomyces cerevisiae*, є новим напрямом біотехнології. Дріжджі мають високий рівень безпеки, добре піддаються генетичній модифікації, а їх культивування не потребує стерильних умов, як у випадку з бактеріями. Проте титри ГК у дріжджах поки що поступаються бактеріальним системам (0,5–2 г/л), а молекулярна маса продукту часто є нижчою. Основними завданнями є оптимізація експресії гіалуронатсинтази та забезпечення достатньої кількості прекурсорів для синтезу ГК. [7, 8, 12]

Порівняльну характеристику продуцентів наведено в табл. 1.1.

Таблиця 1.1 - Порівняльна характеристика продуцентів ГК

Продуцент	Безпека	Титр ГК, г/л	Молеку- лярна маса, кДа	Особливості
<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	-	6–7	1000–3000	Патогенність, токсини
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	+	20–32	500–2000	GRAS, гнучкість, масштабування
<i>Bacillus subtilis</i>	+	7–10	500–1500	GRAS, потребує оптимізації
<i>Kluyveromyces lactis</i>	+	0,5–2	100–500	Безпека, низький титр

Треба відмітити, що ідеальний мікроорганізм для виробництва ГК повинен мати статус GRAS (загалом вважається безпечним), не виділяти жодних токсинів і бути здатним безперервно виробляти біополімер, щоб він міг досягти щонайменше 1 мегадальтон (МДа). Молекулярна маса (MW) і чистота ГК свідчать про її якість: полімери з більшою MW (>0,5 МДа) мають більшу ринкову цінність. [7]

Сучасна біотехнологія спрямована на створення високопродуктивних, безпечних і економічно ефективних штамів-продуцентів ГК. Основні тенденції включають:

- застосування метаболічного інженерування для підвищення продуктивності,
- використання альтернативних (відновлюваних) субстратів,
- оптимізацію умов ферментації та очищення продукту,
- впровадження автоматизованих систем контролю процесу.

Особливу увагу приділяють також екологічній безпеці виробництва, мінімізації відходів і використанню «зелених» технологій. [12, 14]

Вибір продуцента гіалуронової кислоти визначає не лише ефективність та економіку виробництва, а й безпеку кінцевого продукту. Перехід від патогенних стрептококів до GRAS-мікроорганізмів, таких як *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus subtilis* та дріжджі, є ключовою тенденцією сучасної біотехнології. Подальший розвиток генно-інженерних технологій і оптимізація біопроцесів дозволять отримувати ГК високої якості для різних галузей застосування.

1.4. Середовища для культивування корінебактерій

Традиційно культуральне середовище для виробництва гіалуронової кислоти базується на складних цукрах, таких як глюкоза та фруктоза, але вони занадто здорожують собівартість цільового продукту. Тому в наукових публікаціях досліджуються альтернативні джерела поживних речовин для

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		13

культивування продуцентів ГК. Більш оптимальними дослідники визначають такі:

1. Сільськогосподарські відходи, такі як жом цукрових буряків, кукурудзяний розчин, пшеничні висівки, пептон овечої вовни тощо. Ці побічні продукти сільського господарства вважають придатними субстратами для виробництва ГК. Вони легкодоступні та мають додаткову перевагу, оскільки є екологічно чистими.
2. Промислові відходи, такі як барда лікero-горілчаних заводів, патока, сирна сироватка, казеїновий пептон та пептон тунця серед інших. Ці відходи часто дешевші, ніж традиційні субстрати, що робить їх привабливим варіантом для комерційного виробництва.
3. Синтетичні субстрати, такі як гідролізати крохмалю та целюлози. Ці субстрати відносно дешеві та прості у виробництві.

Загалом, були досліджені альтернативні джерела як субстрати для культуральних середовищ для виробництва гіалуронової кислоти, щоб знизити витрати на виробництво та зробити процес більш стійким. Хоча для повного розуміння потенціалу цих альтернативних джерел необхідні додаткові дослідження, вони пропонують багатообіцяючі можливості для майбутнього виробництва гіалуронової кислоти. [9-11, 14]

Важливим завданням організації виробництва ГК мікробним синтезом в промислових масштабах є підтримка низької вартості виробництва. Для вирішення цієї проблеми досліджуються альтернативні складники культуральних середовищ, такі як сільськогосподарські відходи, промислові відходи та синтетичні субстрати, але найбільш відповідний субстрат буде залежати від використовуваних мікроорганізмів і масштабу виробництва.

Висновок до розділу 1:

Проаналізовано джерела літератури щодо фізіологічних та терапевтичних властивостей карнітину, механізмів його дії та напрямів застосування, проведено огляд асортименту препаратів на основі карнітину,

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		14

проаналізовано фізико-хімічні властивості та способи отримання цієї сполуки, форми препаратів, їх наявність та біодоступність, яку вони забезпечують. Зроблено висновок про перспективність розробки та виробництва препаратів карнітину для орального застосування у ліпосомальній формі.

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
						15
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

2 ХАРАКТЕРИСТИКА ГОТОВОГО ПРОДУКТУ, СИРОВИНИ, МАТЕРІАЛІВ, НАПІВПРОДУКТІВ

2.1 Характеристика готового продукту

Назва готового продукту: Кислота гіалуронова високомолекулярна мікробного походження».

Форма продукту: порошок.

Форма випуску: по 0,5 кг у пляшках пластикових, закупорених кришкою з контролем першого розкриття.

Основні показники якості

Опис: Білий або майже білий порошок, без запаху, без видимих сторонніх включень.

Ідентифікація. Метод ІЧ-спектроскопії: підтвердження структури (N-ацетилглюкозамін і глюкуронова кислота).

Молекулярна маса. $>1,0 \times 10^6$ Да (Метод гель-фільтраційної хроматографії).

Чистота. Вміст білкових домішок $<0,1\%$, нуклеїнових кислот $<0,5\%$, ендотоксинів $<0,05$ ЄС/мг (метод LAL-тесту).

Вологість. Не більше 10% (при 105 °С протягом 4 годин).

Вміст ГК. Не менше 95% (метод ВЕРХ).

В'язкість. >1000 мПа·с (1% розчин при 25 °С, в'язкозиметр).

Мікробіологічна чистота. Загальна обсемененість <10 КУО/г, відсутність патогенів (E. coli, Salmonella).

pH. 6,0–7,5 (10% водний розчин, потенціометрично).

Умови зберігання: Зберігати в оригінальному упакованні для захисту від впливу світла при 2-8 °С.

Термін придатності. 2 роки.

Призначення. Продукт рекомендований для використання в косметології, медицині та біотехнологіях (наприклад, ін'єкції, філлери, офтальмологічні розчини) як зволожувач, гелеутворювач, біосумісна речовина.

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		16

2.2 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів

Характеристика сировини, матеріалів, напівпродуктів наведена у таблиці 2.3.

Таблиця 2.3 - Характеристика сировини, матеріалів, напівпродуктів, що використовуються при виробництві продукту «Кислота гіалуронова високомолекулярна мікробного походження» в контейнерах по 0.5 кг.

Найменування	Категорія та номер НТД	Показники НТД, обов'язкові для перевірки	Примітка
1	2	3	4
1. Основна сировина			
Штам <i>Corynebacterium glutamicum</i> Cg-dR-CLS	Паспорт культури	Мікро-та макроморфологічні властивості, біохімічні проби, життєздатність, чистота культури	Продуцент ГК
Глюкоза	ДСТУ 4464:2005	Зовнішній вигляд, смак, колір, запах, вологість, мікробіологічні показники, жиру, фізико-хімічні показники глюкози, ртуть, миш'як, мідь, свинець, кадмій, цинк	Компонент живильного середовища
Сечовина	ЄФ 11.0 [21]	Опис, розчинність, ідентифікація, специфічне оптичне обертання, домішки Н та І, супутні речовини, важкі метали, сульфатна зола, вода (не більше 2,0 %), кількісний вміст (98,0-102,0 % , у перерахунку на суху речовину)	Те ж
Калію фосфат двозаміщений			Те ж
Калію фосфат однозаміщений	ДСТУ 7274:2012	Зовнішній вигляд, колір, запах, вологість. Кальцій-іону, магній-іону, сульфат-іону, калій-іону, оксиду заліза (ІІІ), сульфату натрію, нерозчинного залишку, вологи, рН	Те ж

Продовження таблиці 2.1

1	2	3	4
Магнію сульфат	ДСТУ 7274:2012	Масова частка кальцію та магнію карбонатів, речовин, нерозчинних в соляній кислоті	Те ж
Кальцію хлорид	ДСТУ 7274:2012	Зовнішній вигляд, кількісний вміст, волога	Те ж
Заліза сульфат	ДСТУ 2463	Зовнішній вигляд, кількісний вміст, волога	Те ж
Мангану сульфат	ГОСТ 435	Зовнішній вигляд, кількісний вміст, волога	Те ж
Біотин	НТД виробника	Зовнішній вигляд, кількісний вміст, домішки, мікробна чистота	Те ж
Протокатехова кислота	НТД виробника	Зовнішній вигляд, кількісний вміст, домішки, мікробна чистота	Те ж
Вода очищена	ДФУ 2 вид., доп. 2, ст. 129 [21]	Опис, нітрати, вміст загального органічного вуглецю або речовини, що окиснюються, питома електропровідність, мікробіологічна чистота	Допоміжна речовина, розчинник
2. Допоміжна сировина			
Вода очищена	ДФУ 2 вид., доп. 2, ст. 129 [21]	Опис, нітрати, вміст загального органічного вуглецю або речовини, що окиснюються, питома електропровідність, мікробіологічна чистота	Для миття флаконів, для санпідготовки обладнання
Вода питна	ДСанПіН 2.2.4-171-10	Не входить до переліку сировини, що підлягає вхідному контролю.	Для отримання води очищеної та для санпідготовки
Водню пероксид	ОСТ 301-02-205-99, марка мед. ГОСТ 177-88, змін. №1, №3	Зовнішній вигляд, масова частка пероксиду водню, масова концентрація вільної кислоти (у перерахунку на сірчану кислоту), масова концентрація нелетючого залишку, вміст миш'яку, Мікробіологічна чистота	Для приготування дезінфікуючого розчину

Продовження таблиці 2.1

1	2	3	4
Мийний засіб	НТД виробника, дозвіл на використання	Не входить до переліку сировини, що підлягає вхідному контролю	Для санобробки, для приготування дезрозчину
Спирт етиловий ректифікований	ДСТУ 4221:2003 «Екстра», «Вищої очистки»	Опис, колір, смак, запах, об'ємна частка етилового спирту, проба на чистоту із сірчаною кислотою, проба на окислюваність, мікробіологічна чистота	Для приготування дезінфікуючого розчину
Сульфанол	ТУ 075105 08. 135-98	Згідно з вимогами ТУ	Миючий засіб
Хлорне вапно	ГОСТ 1692-85	Не входить до переліку сировини, що підлягає вхідному контролю	Дезінфекція обладнання
3. Матеріали:			
Етикетки самоклейки	ТУ 9570-001-13866117-2009	Щільність, товщина, ширина бобіни, зовнішній вигляд	Для етикетування
Марля медична	ТУ У 24.4-34588794-001:2007 Тип 17, шир. 90 см	Не входить до переліку сировини, що підлягає вхідному контролю	Для допоміжних цілей
Кришки (з контролем першого відкриття)	Марка 1,4К (горловина GL18), ТОВ «Фарммаш», НТД виробника	зовнішній вигляд, колір, основні розміри	Для пакування препарату
Рукавички медичні	ДСТУ EN 455-3:2019	Не входить до переліку сировини, що підлягає вхідному контролю	Для захисту рук
Скотч	ГОСТ 20477-86	Ширина стрічки, товщина клейового шару, довжина, липкість	Для транспортної тари

1	2	3	4
Пляшки пластикові 0,5 л	НТД виробника	Об'єм пляшки, зовнішній вигляд, основні розміри	Для первинної упаковки
3. Проміжні продукти			
Простерилізо ване живильне середовище CGXII	Методика міжопераційного контролю	рН, стерильність, об'єм	Стадія 2
Посівна культура	Те ж	Чистота, життєздатність, концентрація клітин, фізіологічний стан, об'єм	Стадія 3
Культуральн а рідина	Те ж	Відсутність сторонньої мікрофлори, в'язкість, концентрація ГК, об'єм	Стадія 4
Порошок ГК	Те ж	зовнішній вигляд, вологість, молекулярна маса ГК, чистота, в'язкість, рН, вага	Стадія 5

2.3 Характеристика біологічного об'єкту

Як біологічний об'єкт в роботі обрано бактерію *Corynebacterium glutamicum*.

Corynebacterium glutamicum — це грампозитивна, аеробна, мезофільна бактерія, що належить до роду *Corynebacterium* родини *Corynebacteriaceae*, класу *Actinobacteria*. Вперше ізольована у 1950-х роках із ґрунту як мікроорганізм, здатний продукувати L-глутамат, вона стала однією з ключових бактерій у промисловій біотехнології, зокрема для виробництва амінокислот, зокрема глутамату і лізину, а також гіалуронової кислоти (ГК) [1, 2, 6].

Морфологія

C. glutamicum має паличкоподібну (циліндричну) форму, типову для багатьох бактерій роду *Corynebacterium*. Клітини грампозитивні, що

підтверджується товстим шаром пептидоглікану у клітинній стінці. Особливістю є наявність у клітинній стінці коротколанцюгових міколових кислот, арабіно-галактанових полімерів і мезо-діамінопімелінової кислоти, що надає їй унікальну структуру та підвищену стійкість до зовнішніх впливів. Ця особливість відрізняє *C. glutamicum* від інших грампозитивних бактерій і робить її клітинну оболонку більш складною. [4, 9, 12].

Клітини є нерухомими, не утворюють спор, а їх розмір варіюється приблизно від 1 до 3 мкм у довжину. За сприятливих умов росту вони утворюють поодинокі палички або короткі ланцюжки. [1, 2, 6].

Вигляд клітин під мікроскопом та вигляд росту на середовищі 535a наведено на рис. 2.1. та рис. 2.2.

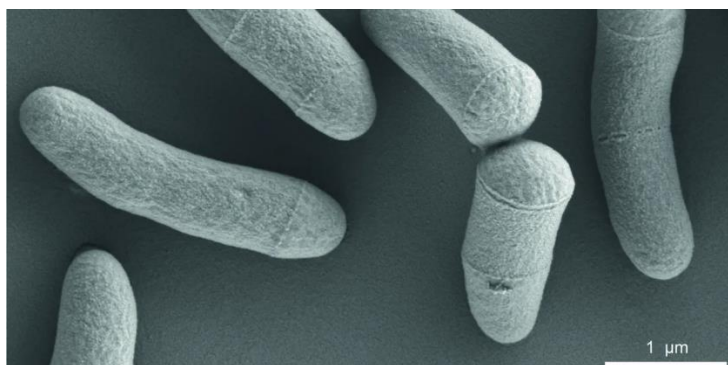


Рис. 2.1. *Corynebacterium glutamicum* під скануючим електронним мікроскопом. [Джерело:

<https://www.bionity.com/fr/news/1185208/corynebacterium-glutamicum-un-champion-cache.html>]



Рис. 2.2. Ріст *Corynebacterium glutamicum* на середовищі 535a (37°C).

[Джерело: <https://bacdiv.dsmz.de/strain/3090>]

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		21

Фізіологічні властивості

Corynebacterium glutamicum — облігатний аероб, тобто для росту і метаболізму потребує кисню. Оптимальна температура росту — 28–30 °С, що відповідає мезофільним умовам. Вона здатна рости на різних джерелах вуглецю, зокрема на глюкозі, лактаті, ацетаті, піруваті, ксилосі та інших вуглеводах, що робить її метаболізм гнучким і адаптивним до різних середовищ. [5, 6]

Метаболічно *C. glutamicum* характеризується активним гліколізом і циклом пентозофосфатів при наявності глюкози, а при дефіциті глюкози активуються глюконеогенез і цикл трикарбонових кислот. Вона має низьку активність оксоглутаратдегідрогеназного комплексу, що впливає на продукцію амінокислот, зокрема глутамату. Енергетичний обмін ефективний, з високою активністю ферментів, таких як піруватдегідрогеназа, ізоцитратдегідрогеназа та цитохром с оксидаза, які підтримують високу продуктивність росту. [6, 7]

C. glutamicum не утворює ендотоксинів (на відміну від грамнегативних бактерій), що робить її безпечною для промислового застосування (статус GRAS — Generally Recognized As Safe).

Потреба в поживних речовинах

Для культивування *C. glutamicum* необхідне живильне середовище, яке містить джерела вуглецю, азоту, мінеральні солі та вітаміни. Основним джерелом вуглецю зазвичай служить глюкоза, але можуть використовуватися також інші цукри, органічні кислоти та амінокислоти.

Азот може надходити у вигляді амонію, амінокислот або пептидів. Додатково для росту потрібні мінерали, такі як Mg^{+2} , Mn^{+2} , фосфати, які беруть участь у ферментативних реакціях і стабілізують клітинні структури. [1, 9]

Дослідження показали, що *C. glutamicum* активно споживає амінокислоти, особливо L-аспарагін і L-глутамін, які мають високі показники споживання і підтримують швидкий ріст. При підвищеній концентрації

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
						22
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

комплексних поживних речовин (наприклад, у вигляді бульйонів ВНІ) знижується енергетична витрата клітин, що сприяє більш ефективному росту і продуктивності. [1, 9]

Біотехнологічне значення

Corynebacterium glutamicum є одним з найважливіших мікроорганізмів у промисловій біотехнології. Вона широко використовується для виробництва амінокислот (L-глутамат, L-лізин), а також як платформа для синтезу інших біополімерів, зокрема гіалуронової кислоти. Завдяки гнучкості метаболізму і можливості генетичного модифікування, *C. glutamicum* є ефективним виробником ГК з високою молекулярною масою, що має велике значення у фармацевтиці та косметології. [11, 12, 25]

Отже, *Corynebacterium glutamicum* — грампозитивна, аеробна, мезофільна бактерія з унікальною клітинною стінкою, що забезпечує їй високу стійкість і специфічні фізіолого-біохімічні властивості. Вона здатна рости на різних джерелах вуглецю і азоту, має ефективний метаболізм і є безпечною для промислового використання. Поживні потреби включають глюкозу або інші цукри, амінокислоти, мінерали і вітаміни. Завдяки цим характеристикам *C. glutamicum* є основою для виробництва амінокислот і гіалуронової кислоти у біотехнології.

2.4. Біосинтез цільового продукту.

Гіалуронова кислота — це природний глікозаміноглікан, що складається з повторюваних дисахаридних одиниць, утворених чергуванням D-глюкуронової кислоти та N-ацетил-D-глюкозаміну. Вона має високу біосумісність, здатність утримувати воду і широко застосовується у медицині, косметології та харчовій промисловості. Промислове виробництво НА традиційно базувалося на ферментації патогенних стрептококів, що викликало ризики забруднення токсинами. Тому останніми роками значну увагу приділяють гетерологічному синтезу НА в безпечних мікроорганізмах,

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		23

зокрема в *Corynebacterium glutamicum* — GRAS-хості, який є оптимальним для масштабного біотехнологічного виробництва [2, 10].

Corynebacterium glutamicum природно не синтезує гіалуронову кислоту, тому для її виробництва застосовують генетичне інженерування, що вводить у клітину гени, відповідальні за синтез ГК. Основними є гени *hasA*, *hasB* та *hasC*, що кодують ферменти:

- *hasA* — гіалуронова синтаза, яка каталізує полімеризацію ГК з двох прекурсорів: UDP-глюкуронової кислоти та UDP-N-ацетилглюкозаміну;
- *hasB* — UDP-глюкозо-6-дегідрогеназа, що забезпечує утворення UDP-глюкуронової кислоти;
- *hasC* — UDP-глюкозо-пірофосфорилаза, що бере участь у синтезі UDP-глюкози, попередника UDP-глюкуронової кислоти [9].

Впровадження цих генів у *C. glutamicum* дозволяє сформувати повний шлях біосинтезу ГК, що раніше був відсутній.

Основою для синтезу ГК є вуглеводний метаболізм клітини, зокрема гліколіз, пентозофосфатний шлях і цикл трикарбонових кислот (ЦТК). Глюкоза, основне джерело вуглецю, надходить у клітину через специфічні транспортери (*iolT1/iolT2*), а потім метаболізується до пірувату. Для підвищення продуктивності ГК в *C. glutamicum* застосовують різні стратегії метаболічного інженерування:

1. *Покращення поглинання глюкози.* Вилучення гена *iolR*, який пригнічує транспортери глюкози і глюкостілази, сприяє кращому надходженню субстрату в клітину, збільшуючи доступність прекурсорів для ГК [10].
2. *Підсилення синтезу кардіоліпіну.* Кардіоліпін — важливий компонент клітинної мембрани, що впливає на активність мембранних білків, у тому числі гіалуронової синтази. Надекспресія генів *pgsA1*, *pgsA2* та *cls*, що відповідають за синтез кардіоліпіну, покращує стабільність і активність *hasA*, підвищуючи вихід ГК [10].

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		24

3. *Оптимізація енергетичного балансу.* Введення гена *Vitreoscilla* гемоглобіну (VNb) у геном *C. glutamicum* покращує аерацію і енергетичний метаболізм, збільшуючи рівень АТФ і співвідношення NAD^+/NADH , що позитивно впливає на синтез ГК [10].
4. *Забезпечення амінокислотного живлення.* Глутамін виявився важливим фактором для синтезу ГК, оскільки він є джерелом азоту для утворення UDP-N-ацетилглюкозаміну. Додаткове внесення глутаміну підвищує продуктивність ГК [10].
5. *Блокування побічних шляхів.* Вилучення лактатдегідрогенази (LDH) зменшує утворення лактату — побічного продукту, що відволікає вуглець від синтезу ГК, тим самим підвищуючи вихід цільового продукту [9].

Дослідження показали, що оптимальними для синтезу ГК в *C. glutamicum* є комплекси генів *hasAB* та *hasABC*, які забезпечують ефективний синтез прекурсорів і полімеризацію ГК. Реконбінантні штами з такими конструкціями демонструють вищі титри ГК і кращу молекулярну масу продукту [9].

Завдяки системному метаболічному інженеруванню, включно з регуляцією шляхів гліколізу, пентозофосфатного циклу, а також шляхів синтезу ГК, було досягнуто значного підвищення концентрації ГК в культуральній рідині. Наприклад, у дослідах із використанням штаму CgHA25 було отримано до 28,7 г/л ГК у ферментері з високою молекулярною масою (приблизно 210 кДа). Подальше поєднання стратегій, таких як покращення транспорту глюкози, підсилення синтезу кардіоліпіну, введення VNb і додавання глутаміну, дозволило досягти титрів до 32 г/л за 60 годин у режимі fed-batch [2, 7, 9, 25].

Використання *Corynebacterium glutamicum* як безпечного і ефективного виробника ГК відкриває нові можливості для промислового виробництва біополімеру з високою молекулярною масою і чистотою, що є критично важливим для фармацевтичних і косметичних застосувань. Метаболічне

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		25

інженерування дозволяє не лише підвищити продуктивність, але й контролювати якість продукту, зокрема молекулярну масу ГК, що визначає її фізико-хімічні та біологічні властивості.

Біосинтез гіалуронової кислоти в *Corynebacterium glutamicum* базується на введенні і оптимізації експресії генів *hasA*, *hasB*, *hasC*, що забезпечують синтез і полімеризацію НА. Метаболічне інженерування шляхів поглинання глюкози, енергетичного метаболізму, а також блокування побічних шляхів і підтримка амінокислотного живлення суттєво підвищують вихід НА. Розроблені інженерні штами демонструють високі титри НА з контролем молекулярної маси, що робить їх перспективними для промислового виробництва безпечної, якісної гіалуронової кислоти.

Висновок до розділу 2:

Наведено опис та основні показники якості готового продукту. Проведено аналіз сировини та матеріалів, що застосовують у виробничому процесі щодо необхідних показників для перевірки забезпечення якісної продукції. Розглянуто характеристики та властивості коринебактерії, яка є продуцентом гіалуронової кислоти, та основні стратегії інженерії рекомбінантних штамів, спрямовані на посилення біосинтезу цільового продукту.

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
						26
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

З ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

3.1 Розрахунок матеріального балансу

Для розрахунку матеріального балансу та визначення кількості генерацій для отримання 100 кг гіалуронової кислоти від *Corynebacterium glutamicum* з виходом 32 г/л виконаємо покроковий аналіз. Вихід 32 г/л вказує на концентрацію ГК в культуральній рідині після культивування.

Розрахуємо об'єм культурального середовища:

$$V = \frac{M_{\text{ГК}}}{C_{\text{ГК}}} = \frac{100000}{32} \approx 3125 \text{ л}$$

де $M_{\text{ГК}}$ – розмір серії ГК, г; $C_{\text{ГК}}$ – вихід ГК з 1 л середовища, г/л.

Припустимо, що вихід 32 г/л досягається в оптимальних умовах культивування. Матеріальний баланс включає розрахунки сировини для отримання заданої кількості продукту (100 кг) з урахуванням втрат. [28, 30]

Розрахунок кількості середовища з урахуванням його складу на 1 л (таблиця 3.4):

- Глюкоза: $20 \text{ г/л} \times 3125 \text{ л} = 62\,500 \text{ г} = 62,5 \text{ кг}$
- Амонію сульфат: $20 \text{ г/л} \times 3125 \text{ л} = 62\,500 \text{ г} = 62,5 \text{ кг}$.
- Сечовина: $5 \text{ г/л} \times 3125 \text{ л} = 15\,625 \text{ г} = 15,6 \text{ кг}$.
- Інші компоненти (K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , MgSO_4 тощо): сума 7,2 кг.
- Вода: основна частина об'єму, $\sim 3125 \text{ л} = 3125 \text{ кг}$.

Розрахунок втрат:

- Біомаса *C. glutamicum*: зазвичай $\sim 10\text{--}15\%$ від маси субстрату, тобто $\sim 6\text{--}9$ кг. Приймаємо 8 кг.
- CO_2 , H_2O (продукти метаболізму): зазвичай $\sim 20\text{--}30\%$ від маси глюкози, тобто $\sim 12\text{--}18$ кг. Приймаємо 15 кг.
- Втрати (невикористаний субстрат, домішки): зазвичай $\sim 5\text{--}10$ кг, приймаємо 7 кг.

Отже, маємо загальний матеріальний баланс:

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		27

Вхід: 3272,8 кг (вода + сухі компоненти).

Вихід: 130 кг (ГК + біомаса + побічні продукти), з урахуванням випаровування та втрат.

Розрахуємо кількість генерацій.

Генерація в мікробіології — це подвоєння біомаси за один цикл росту.

Кількість генерацій (n) розраховується за формулою (3.1):

$$n = \frac{\log_{10}(N_f/N_0)}{\log_{10}(2)},$$

де N_f — кінцева кількість клітин, N_0 — початкова кількість.

Приймаємо початкову концентрацію (посівний матеріал) 10^6 клітин/мл = 10^9 клітин/л, кінцеву концентрацію 10^{10} – 10^{11} клітин/л (залежить від оптимізації).

Тоді

$$n = \log_{10}(10^{11}/10^9) / 0,301 \approx 6-7.$$

Однак, у практиці кількість генерацій залежить від часу культивування (зазвичай 24–48 годин) і швидкості росту ($0,1$ – $0,3$ год⁻¹). Для досягнення 32 г/л ГК зазвичай достатньо 5 генерацій при оптимальних умовах (аерація, рН 7,0, 30°C).

Розрахуємо баланс для об'єму середовища (3125 л), визначеному раніше, із корекцією для 5 генерацій. Густина середовища близька до води, тобто ~ 1 кг/л, тобто маса середовища ~ 3125 кг. Кількість посівного матеріалу приймаємо 5%.

Генерації розподіляються між етапами: пробірка → колба → лабораторний ферментер → проміжний ферментер → основний ферментер. Об'єм подвоюється на кожному етапі, але з урахуванням інокуляції.

Генерація 1 (пробірки, об'єм: 10 мл):

Посівний матеріал: 1 мл із відновленої чистої культури.

Середовище: 10 мл (глюкоза 0,2 г, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,2 г тощо).

Використовуємо 2 пробірки.

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
						28
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Генерація 2 (колби Ерленмейєра по 1000 мл):

Інокулят 10 мл, середовище 200 мл. Використовуємо 2 колби.

Посівний матеріал: 10 мл із пробірки. 2 пробірки – 20 мл.

Середовище: 200 мл (глюкоза 4 г, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 г). На 2 колби 400 мл.

Генерація 3 (скляний бутель 15 л):

Об'єм посівного матеріалу в 2 колбах: $200 \text{ мл} \times 2 = 400 \text{ мл}$.

Середовище: 8 л (глюкоза 160 г = 0,16 кг, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 160 г = 0,16 кг).

$8 + 0,4 = 8,4 \text{ л}$. З урахуванням крапельвиносу 5% отримаємо:

$8,4 - 5 \% = 8 \text{ л}$.

Генерація 4 (проміжний ферментер 300-350 л):

Об'єм посівного матеріалу 8 л.

Середовище: 160 л (глюкоза 3,2 кг, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,2 кг).

$160 + 8 = 168 \text{ л}$. З урахуванням крапельвиносу 5% отримаємо:

$168 - 5 \% = 160 \text{ л}$.

Генерація 5 – основне культивування (ферментер 5,5–6,0 м³):

Об'єм посівного матеріалу: 160 л.

Середовище: 3125 л (глюкоза 62,5 кг, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 62,5 кг, урея 15,6 кг, вода 3125 кг).

$3125 + 160 = 3285 \text{ л}$. З урахуванням крапельвиносу 5% отримаємо:

$3285 - 5 \% = 3125 \text{ л}$.

Отже, загальна кількість генерацій: 5 (10 мл → 20 мл → 400 мл → 8 л → 160 л → 3125 л).

Кінцевий об'єм (3125 л) досягається з урахуванням інокуляції 5 %), що узгоджується з практикою ($160 \text{ л} \times 20 \approx 3200 \text{ л}$, з корекцією до 3125 л через втрати чи додавання).

Загальний об'єм середовища : $0,02 + 0,4 + 8 + 160 + 3125 = 3293,42 \text{ л}$.

На втрати при приготуванні, стерилізації тощо приймаємо 3,2%.

$3293,42 + 3,2\% = 3400 \text{ л}$.

Отже, розраховано кількість середовища на серію 100 кг ГК:

- об'єм 3400 л

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		29

- вага 3560,855 кг (табл. 3.4).

Матеріальний баланс післяферментаційних стадій виробництва продукту «Кислота гіалуринова високомолекулярна мікробного походження» в контейнерах по 0.5 кг наведено в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1 – Матеріальний баланс післяферментаційних стадій виробництва продукту «Кислота гіалуринова високомолекулярна мікробного походження» в контейнерах по 0.5 кг

Найменування	Вміст осн. речовини, % Волога %	Витрачено та отримано				
		Маса, кг			Об'єм, л	Кількість, шт
		Загальна	Основної речовини	Кг/моль		
1	2	3	4	5	6	7
Стадія ТП 5. Виділення та очищення гіалуринової кислоти.						
<i>Витрачено на операції ТП 5.1. Відділення біомаси</i>						
<i>Б. Напівпродуктів:</i>						
Культуральна рідина ($\rho=1,047$ г/л)		3272,8			3125	
Всього:		3272,8			3125	
<i>Отримано на операції ТП 5.1</i>						
<i>Б. Напівпродуктів:</i>						
Фугат з ГК		2900,0			2900	
<i>В. Відходів:</i>		-				
<i>Г. Втрат:</i>					225,0	
Осад, в тому числі:		372,8				
- біомаса ($\rho=1,100$ г/л)		8,8			8,0	
- залишки культуральної рідини		364,0			217,0	
Всього:		3272,8			3125	
<i>Витрачено на операції ТП 5.2 Ультрафільтрація..</i>						
<i>Б. Напівпродуктів:</i>						
Фугат з ГК		2900,0			2900	
Всього:		2900,0			2900	
<i>Отримано на операції ТП 5.2</i>						
<i>Б. Напівпродуктів:</i>						
Концентрат з ГК (10 г/л)		1100,0			1000	
<i>В. Відходів:</i>						

Продовження таблиці 3.2

1	2	3	4	5	6	7
<i>Г. Втрат:</i>						
Ультрафільтрат, тому числі:		1800,0			1900	
Всього:		2900,0			2900	
Витрачено на операції ТП 5.3. Сушка гіалуронової кислоти						
<i>Б. Напівпродуктів:</i>						
Концентрат з ГК (10 г/л)		1100,0				
Всього:		1100,0				
Отримано на операції ТП 5.3						
<i>Б. Напівпродуктів:</i>						
Порошок ГК		102,0				
<i>В. Відходів:</i>						
<i>Г. Втрат:</i>						
Волога		998,0				
Всього:		1100,0				
Витрачено на стадії ПМВ 6. Пакування, маркування та відвантаження готового продукту.						
<i>Б. Напівпродуктів:</i>						
Порошок ГК		102,0				
<i>В. Матеріали:</i>						
Пляшки з кришками						203
Всього:		102,0				203
Отримано на стадії ПМВ 7.						
<i>А. Готового продукту:</i>						
«Кислота гіалуронова високомолекулярна мікробного походження» в контейнерах по 0,5 кг		100,0				200
<i>В. Відходів:</i>						
<i>Б. Втрат:</i>						
Порошок ГК (технологічні та на контроль)		2,0				
Пляшки з кришками						3
Всього:		102,0				203

3.2 Розрахунок і вибір основного та допоміжного обладнання

Вибір основного та допоміжного обладнання для організації виробництва гіалуронової кислоти здійснювали з урахуванням досвіду проектування виробництв фармацевтичної, ветеринарної та біотехнологічної промисловості ТОВ «Інженіум груп». Брили до уваги рекомендації фахівців ТОВ «Інженіум груп» для підбору обладнання з урахуванням його технічних характеристик для забезпечення виробництва серії продукту «Кислота гіалуронова високомолекулярна мікробного походження» в пляшках полімерних по 0,5 кг, яка складає 100,0 кг за вагою кислоти гіалуронової, або 200 упаковок.

3.2.1 Машина для дозування та наповнення порошку ГФ 26.

Для фасовки порошку кислоти гіалуронової запропоновано використання машини марки FP-60 з продуктивністю по пляшкам 20–40 шт./хв. За даними матеріального балансу на наповнення надходить 204 пляшки.

Для апаратів безперервної дії розраховують кількість одиниць обладнання за формулою 3.1 [28]:

$$N = M_{зм} / (T_{еф.р.} \times m) \quad (3.1)$$

де N – кількість апаратів, од;

$M_{зм}$ – кількість продукту, що оброблюється на апараті за зміну, шт.;

$T_{еф.р.}$ - ефективний час роботи апарату за зміну, год (4-6 год при 8-годинній зміні);

m – продуктивність апарату, пляшок/год.

$$N = 204 / (5 \times 1200) = 0,04$$

Отже, достатньо по 1 одиниці такої машини.

Розрахуємо тривалість роботи для машини наповнення за формулою 3.2 [28]:

$$Tp = \frac{G_1}{q} * n \quad (3.2)$$

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		32

де T_p – час роботи, год.; G_1 – кількість продукту, що переробляється за цикл, шт; q – продуктивність машини кг/год; n – число машин або установок.

$$T_p = 204 / 1200 = 0,2$$

Визначимо коефіцієнт ефективності використання машини для дозування та наповнення порошку $K_{\text{еф. вик}}$ за формулою 3.3 [28]:

$$K_{\text{еф. вик.}} = (T_{\text{ф. р.}} + T_{\text{п. з.}}) / T_{\text{зм}}, \quad (3.4)$$

Де $T_{\text{ф. р.}}$ – фактичний час роботи обладнання, год; $T_{\text{п. з.}}$ – час на підготовчо-заготівельні операції обладнання (зборка, вихід на режим роботи, розбирання та мийка), год (у середньому 1 – 1,5 год); $T_{\text{зм}}$ – тривалість зміни, год.

$$K_{\text{еф. вик.}} = (0,2 + 1,5) / 8 = 0,22$$

Отже, запропонована машина має задовільну продуктивність для запланованого розміру серії. Обладнання має потенціал для збільшення розміру серії або може бути використана для фасування ще й інших продуктів (за потребою).

3.2.2. Ваги електронні КП 2 та КП 2.

За даними матеріального балансу для приготування живильного середовища необхідно відважити 11 наважок вагою від 0,68 г до 68 кг. Зробити це на одних вагах неможливо.

Тому для зважування наважок для приготування живильного середовища в кількості від 102 г до 0,68 г (кальцію хлорид, заліза сульфат, мангану сульфат, біотин, протокатехова кислота) запропоновано використання ваг електронних марки ЕР 613 з мінімальною поділкою зважування 0,001 г, максимальним розміром наважки 610 г, II класом точності.

Для зважування наважок від 850 г до 68 кг (глюкоза, амонію сульфат, сечовина, калію фосфат двозаміщений та однозаміщений, магнію сульфат) підібрано ваги торгівельні з РК-дисплеєм марки Grunhelm GSC-051, з найбільшою границею зважування 50 кг, дискретністю 5 г, II класом точності.

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
						33
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Отже, запропоновані марки вагів мають необхідний рівень точності та дозволяють зважувати наважки за одне зважування.

3.2.3. Реактор Р 14, інокулятор Р 16, ферментер Ф 18, збірники З 19, З 21, З 23, З 25

Для приготування живильного середовища запропоновано використання реактору Р 14 марки РС 4,0, з робочим об'ємом 4000 л. На серію готують 3400 л середовища.

Розрахуємо коефіцієнт заповнення:

$$3400 / 4000 = 0,85$$

Для реакторів, що використовують для приготування розчинів, це є прийнятним.

Для отримання культури 3 генерації у інокулятор Р 16 завантажують середовище в кількості 160 л та посівний матеріал в кількості 8 л.

Розрахуємо, якої місткості треба використати ферментер для культивування з урахуванням коефіцієнту заповнення 0,6:

$$V_f = V/K_{\text{зап}} = 168 / 0,6 = 280$$

Запропоновано в якості інокулятора Р 16 використання ферментатору марки ПФ-300, загальним об'ємом 300 л.

Для проведення основної ферментації у ферментер Ф 18 завантажують середовище в кількості 3125 л та посівний матеріал в кількості 160 л.

Розрахуємо, якої місткості треба використати ферментер для культивування з урахуванням коефіцієнту заповнення 0,6:

$$V_f = V/K_{\text{зап}} = (3125+160) / 0,6 = 5475 \text{ л}$$

Запропоновано в якості ферментера Ф 18 використання ферментатору марки FXZ6.0, загальним об'ємом 6000 л.

Для забезпечення ефективної сепарації доцільно перед сепаратором встановити як буферний бак збірник для культуральної рідини З 19. Запропоновано збірник марки РУ2500М, оснащений сорочкою для підтримки

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		34

оптимальної для сепарування температури, мішалкою, оглядовим люком, тензометричним пристроєм для контролю маси вмісту в збірнику, місткістю 2500 л. Такі конструкційні особливості та об'єм забезпечать поступову подачу культуральної рідини в кількості 3125 л з регульованим потоком і певною концентрацією клітин.

Після сепарації утворюється фугат з гіалуроновою кислотою в кількості 2900 л. Для збору фугату рекомендовано використання двох збірників типу ZA-1600L, які мають загальний об'єм 2000 л, робочий - 1600 л, є пересувними. Загальна місткість є достатньою, а використання двох збірників меншого розміру є доцільним для маневрування виробничими приміщеннями.

Збірник того ж типу та місткості пропонується використовувати для збору концентрату після ультрафільтрації кількістю 1000 л. За апаратурною схемою це збірник З 25.

3.2.4. Розрахунок основного апарату – Ультрафільтраційна установка Ф 22.

Концентрування культуральної рідини після відділення біомаси запропоновано провести шляхом ультрафільтрації. Для вибору установки для ультрафільтрації враховували такі вхідні дані:

Об'єм фугату: 2900 л

Початкова концентрація ГК: $3,2 \pm 0,2$ % (32 ± 2 г/л)

Цільова концентрація ГК в концентраті: 7–10% (70–100 г/л)

Тиск ультрафільтрації: 0,1–0,3 МПа

Температура: 20–30 °С

Продуктивність мембранної установки: 1–3 м³/год

З огляду на вихідні дані та пропозиції ринку, запропоновано використання ультрафільтраційної установки UF 0,2 виробництва компанії «Охумо Technology», Китай.

Технічні характеристики:

Тип мембрани - порожниста волоконна.

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		35

НОММ, кДа 300.

Діаметр волокна, мм 1,66/1,0 або 2,4/1,2.

Кількість модулів до 14.

Номінальна площа, м² 6.

Максимальний тиск, МПа 0,3.

Робочий тиск, МПа 0,02-0,08.

Продуктивність, м³/год 1-3.

Габаритні розміри, мм 980x500x1420.

Установка включає:

- резервуар подачі фугату;
- насос подачі на мембранний модуль;
- мембранний ультрафільтраційний модуль;
- резервуар для концентрату (ультрафільтрату);
- резервуар для пермеату.

Мембранні модулі містять ультрафільтраційні мембрани з рейтингом пор 0,02–0,03 мкм, які затримують високомолекулярну гіалуронову кислоту і пропускають низькомолекулярні домішки та воду.

Розрахуємо об'єм концентрату:

Якщо припустити концентрацію ГК в концентраті 7% (70 г/л), тоді:

$$V = \frac{100\,000\text{ г}}{70\text{ г/л}} = 1429\text{ л}$$

Якщо концентрація 10% (100 г/л), тоді:

$$V = \frac{100\,000\text{ г}}{100\text{ г/л}} = 1000\text{ л}$$

Для економічного і технологічно ефективного процесу ультрафільтрації слід досягати концентрації ГК у концентраті не менше 10%. Це дозволить значно зменшити об'єм ультрафільтрату, знизити витрати на сушку і зберігання.

Розрахуємо час роботи установки при продуктивності 2 м³/год (середнє значення):

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
						36
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$T = \frac{2900 \text{ л}}{2000 \text{ л/год}} = 1,45 \text{ год}$$

Для концентрування до 1000–1400 л час може бути близько 2–3 годин із урахуванням циклів промивання та регенерації мембран.

Отже, запропоноване обладнання має задовільну продуктивність для запланованого розміру серії та має потенціал для збільшення розміру серії.

Таблиця 3.3 - Перелік складових частин ультрафільтраційної установки моделі UF 0,2

Фор	Зона	Поз.	Позначення	Найменування	Кільк.	Примітка
			1	Мембранний модуль	1	
			2	Тупік	1	
			3	Колектор фільтрату	1	
			4	Вх ід промивного розчину	1	
			5	Вихід концентрату (ренетанту)	1	
			6	вихід фільтрату (пермеату)	1	
			7	нижній колектор подачі	1	

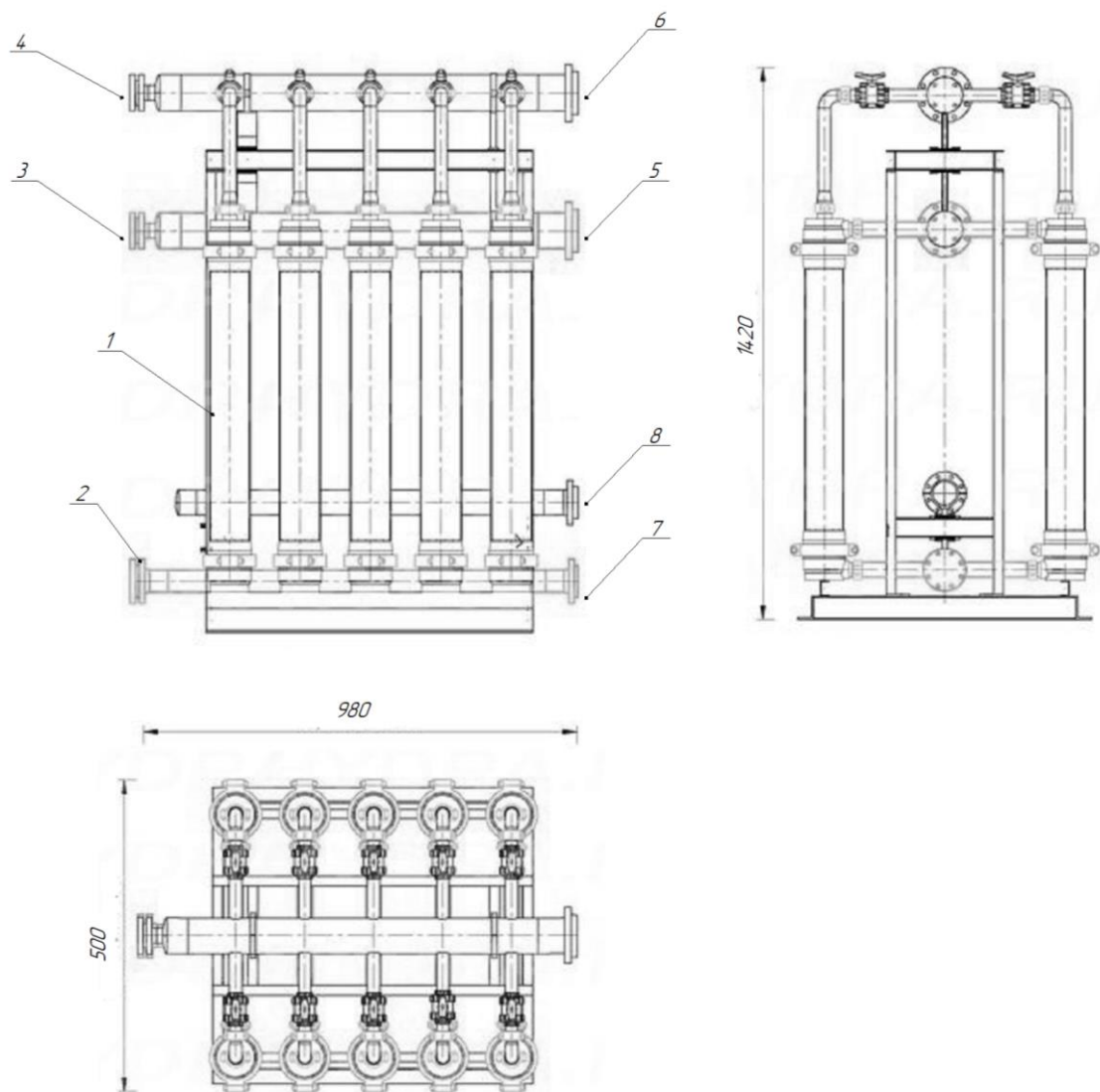


Рисунок 3.1 – Загальний вигляд ультрафільтраційної установки моделі UF 0,2:

1 – мембранний модуль, 2 - тупік, 3 – колектор фільтрату, 4 – вхід промивного розчину, 5 – вихід концентрату (ренетанту), 6 – вихід фільтрату (пермеату), 7 – нижній колектор подачі.

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		38

3.3 Опис технологічного процесу

Технологічний процес виробництва продукту «Кислота гіалуронова високомолекулярна мікробного походження» в пляшках пластикових по 0,5 кг складається з таких стадій:

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва.

ДР 2. Отримання живильного середовища.

ТП 3. Підготовка посівного матеріалу.

ТП 4. Основна ферментація.

ТП 5. Виділення та очищення гіалуронової кислоти.

ПМВ 6. Пакування, маркування та відвантаження готового продукту.

Стадія ДР 1. Санітарна підготовка виробництва.

Підготовка виробництва гіалуронової кислоти до роботи здійснюється відповідно до СТП підприємства та поділяється на підготовку:

- повітря;
- виробничих приміщень;
- обладнання;
- персоналу.

Підготовка повітря

На дільниці з виробництва гіалуронової кислоти функціонує припливно-витяжна вентиляція з триступеневою очисткою, кондиціонуванням повітря за температурою та вологістю. Контролюють рівень механічних часток і мікробну чистоту за СОП, фіксуючи дані в протоколах. (К 1.1)

Підготовка приміщень та обладнання

Проводять щоденне прибирання та щотижневe або генеральне, з використанням бактерицидних ламп після вологого очищення. Обладнання миють і стерилізують після роботи згідно з СОП, готуючи до наступної серії.

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
						39
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Лаборант мікробіологічної лабораторії підприємства контролює чистоту приміщень і обладнання, реєструючи результати в протоколах. (К 1.2)

Підготовка персоналу.

Персонал проходить навчання, інструктажі з гігієни та безпеки, медобстеження за графіком. Перед роботою одягають спецодяг, миють і дезінфікують руки. Контроль проводять за СОП, фіксуючи дані в протоколах. (К 1.3)

Стадія ДР 2. Отримання живильного середовища.

Операція ДР 2.1. Приготування живильного середовища.

Перед приготуванням живильного середовища Відділ контролю якості проводить вхідний контроль сировини за показниками якості згідно з СОП «Контроль сировини, яка поступає у виробництво» за затвердженими методиками. При отриманні позитивних результатів контролю оформлює сертифікат якості та дає письмовий дозвіл на використання сировини у виробництві. (К 2.1.1)

Для культивування *Corynebacterium glutamicum* з метою виробництва гіалуринової кислоти (ГК) використовують мінімальне середовище, яке оптимізує ріст бактерій та синтез ГК - адаптоване середовище на основі CGXII, яке є стандартним для *C. glutamicum* і дозволяє регулювати вихід та молекулярну вагу ГК.

Технолог або майстер зміни розраховує склад середовища на серію, з урахуванням втрат, як зазначено в розділі 3.1. Склад компонентів та їх функції наведено в табл. 3.4.

На вагах КП 1 та КП 2 зважують у маркованих контейнерах 3 3 – 3 13 наважки всіх компонентів середовища у кількостях, вказаних в табл. 3.4. (К 2.1.2)

Виробниче живильне середовище готують в реакторі Р 14. В реактор завантажують воду з дільниці водопідготовки з температурою 45 ± 5 °С у кількості 2800 л та при перемішуванні додають наважки глюкози, амонію

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		40

Таблиця 3.4 – Склад компонентів живильного середовища CGXII

Компоненти середовища	Кількість		Функція компоненту
	На 1 л, г	На серію 3400 л, кг	
1	2	3	4
Глюкоза	20,0	68,00	Основне джерело вуглецю
Амонію сульфат (NH ₄) ₂ SO ₄	20,0	68,00	Джерело азоту
Сечовина	5,0	17,00	Додаткове джерело азоту
Калію фосфат двозаміщений K ₂ HPO ₄	1,0	3,40	Компонент буферної системи і джерело фосфору
Калію фосфат однозаміщений KH ₂ PO ₄	1,0	3,40	
Магнію сульфат MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25	0,85	Джерело магнію
Кальцію хлорид CaCl ₂	0,01	0,034	Джерело кальцію
Заліза сульфат FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01	0,034	Мікроелемент
Мангану сульфат MnSO ₄ ·H ₂ O	0,01	0,034	Мікроелемент
Біотин	0,0002	0,00068	Вітамін, необхідний для росту <i>C. Glutamicum</i>
Протокатехова кислота	0,03	0,102	Сприяє росту
Натрію гідроксид або кислота хлористоводнева	До pH 7,0	До pH 7,0	Коригент pH
Вода очищена	1000,0	3400 л	Розчинник
Вага, кг		3560,855	

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
						41
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

На вагах КП 1 та КП 2 зважують у маркованих контейнерах 3 3 – 3 13 наважки всіх компонентів середовища у кількостях, вказаних в табл. 3.4. (К 2.1.2)

Виробниче живильне середовище готують в реакторі Р 14. В реактор завантажують воду з дільниці водопідготовки з температурою 45 ± 5 °С у кількості 2800 л та при перемішуванні додають наважки глюкози, амонію сульфату, сечовини, калію фосфату одно- та двозаміщеного та магнію сульфату. Наважки кальцію хлориду, заліза сульфату, мангану сульфату, біотину та протокатехової кислоти перед додаванням розчиняють в 500 мл води очищеної та додають в реактор у вигляді розчинів для рівномірного змішування та зменшення втрат міnorних компонентів. Ретельно перемішують до повного розчинення солей 15-20 хв.

Зупиняють мішалку, додають воду очищену до 3400 л за лічильником на матеріалопроводі води та знов ретельно перемішують 15-20 хвилин. (К 2.1.3)

Контролюють рН середовища, який має бути $7,0 \pm 0,2$. При необхідності коригують додаванням 1 М НСІ або NaOH. (К 2.1.4)

Операція 2.2. Стерилізація живильного середовища.

Стерилізують середовище *in situ*. В сорочку реактора Р 14 подають пару та нагрівають середовище до 121 °С та витримують 20 хв. Тиск в реакторі 0,1 МПа. Після завершення терміну витримки припиняють подачу пари, відкривають вентиль зливу конденсату та після зниження тиску до 0 МПа подають в сорочку розсол для охолодження середовища до 30 °С (К 2.2.1).

Відбирають пробу для контролю стерильності (К 2.2.2).

Простерилізоване виробниче живильне середовище CGXII передають на стадії ТП 3 та ТП 4.

Стадія ТП 3. Підготовка посівного матеріалу.

Операція ТП 3.1 Підготовка посівного матеріалу.

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
						42
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Підготовку посівного матеріалу проводять поетапно. Для цього здійснюють 4 генерації культури (див. розділ 3.1).

Роботи з отримання посівного матеріалу генерацій 1-3 проводять в приміщенні лабораторії виробничих культур з локальною зоною класу чистоти В та в приміщенні отримання засівної культури класу чистоти С.

Отримання культури 1 генерації.

Ліофілізований штам *Corynebacterium glutamicum* відновлюють фізіологічним розчином та переносять по 1 мл у 2 стерильні пробірки з 9 мл виробничого живильного середовища CGXII, отриманого на стадії ДР 2. Пробірки інкубують 12 год у термостаті при температурі 30 °С (К 3.1.1).

Культуру контролюють на чистоту (відсутність контамінантів, посів на селективні та загальні середовища), життєздатність і концентрація клітин (оптична густина OD600 3-5), фізіологічний стан (активність гіалуронансинтази, відсутність спорових форм і клітин з аномальною морфологією).

Контролюють фізико-хімічні параметри середовища (рН 6,5–7,5), температура 28–30 °С, концентрація поживних речовин (глюкоза 10-15 г/л, джерела азоту),.

Періодично проводять тестування на відсутність ендотоксинів і токсинів. (К3.1.2)

Отримують 20 мл посівного матеріалу 1 генерації.

Отримання культури 2 генерації.

Збільшують об'єм середовища в 10 разів. Вміст пробірок (20 мл інокуляту) переносять в 2 колби Ерленмейєра місткістю по 1 л, в які поміщено по 200 мл виробничого живильного середовища CGXII, отриманого на стадії ДР 2. Колби інкубують при 30 °С, 200–250 об/хв (на шейкері), 12–18 год до досягнення $OD_{600} \approx 3-5$. (К 3.1.3.).

Культуру 2 генерації перевіряють, як і 1 генерацію (К 3.1.4.)

Отримують 400 мл посівного матеріалу 2 генерації.

Отримання культури 3 генерації.

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
						43
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Збільшують об'єм середовища: вміст колб (400 мл інокуляту) переносять в бутель скляний, в який попередньо помістили 8 л середовища. (К 3.1.3). Бутель поміщають на шутель-апарат в термостатованій кімнаті та витримують при перемішуванні в такому ж режимі, як генерації 1 та 2.

Культуру 3 генерації перевіряють, як і 2 генерацію (К 3.1.6).

Отримують 8 л посівного матеріалу 3 генерації.

Отримання культури 4 генерації.

Далі культуру 3 генерації переносять з бутля у інокулятор Р 16, в який завантажено насосом Н 15 середовище в кількості 160 л. Інкують при тих же умовах та контролюють за тими ж показниками. Додатково контролюють аерацію: має бути 1,0 vvm (К 3.1.7, К 3.1.8).

Отримують 160 л посівного матеріалу 4 генерації.

Отриману посівну культуру передають до стадії ТП 4. Ферментація.

Стадія ТП 4. Основна ферментація.

Операція 4.1 Основна ферментація.

Культивування продуценту для отримання гіалуронової кислоти здійснюють у основному ферментері Ф18. Ємність сконструйована таким чином, що не має «мертвих зон», наявні пробовідбірники для асептичного відбору проб, фільтри стерилізувальні для газів та рідин. Оснащений датчиками температури, тиску, рН, pO_2 , рівня піни, оптичної щільності, редокс-потенціалу, ваги, витратомірами для газів та рідин. Також є система аерації та піногасіння (додавання піногасника).

Насосом Н 17 завантажують стерильне живильне середовище CGXII з стадії ДР 2. Температура середовища 28-32 °С. (К 4.1.1)

Далі середовище інокують посівною культурою, отриманою на стадії 3 в кількості 160 л (К 4.1.2) та починають процес ферментації.

Ферментацію проводять у контрольованому режимі, підтримуючи температура на рівні 29 ± 1 °С. Аерацію встановлюють на рівні 1 vvm, а перемішування - на рівні 600 об/хв. Після 48 годин ферментації перемішування встановлюють на рівні 700 об/хв. рН середовища

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		44

підтримують на рівні $7,2 \pm 2$ автоматичним додаванням розчину натрію гідроксиду 8М або розчину кислоти хлористоводневої 6М.

Концентрацію глюкози вимірюють кожні 24 години. При падінні рівня глюкози менше 10 г/л додають розчин глюкози 800 г/л для забезпечення залишкової концентрації глюкози в межах між 8 і 15 г/л. (К 4.1.3)

Тривалість ферментації 60 ± 2 години і її завершення фіксується за показником динамічної в'язкості культурального середовища, що свідчить про досягнення максимальної концентрації ГК - близько 1,18 мПа·с. Також ураховують концентрацію ГК у розчині, має бути 32 г/л. (К 4.1.4)

В'язкість безпосередньо корелює з накопиченням гіалуринової кислоти, тому її моніторинг є ключовим для визначення кінця процесу.

Після завершення ферментації культуральну рідину з ферментера Р 18 передають насосом Н 17 на стадію ТП 5. Отримання декстрану.

Стадія ТП 5. Виділення та очищення гіалуринової кислоти.

Операція ТП 5.1. Відділення біомаси.

Після ферментації проводять сепарацію культуральної рідини для відокремлення клітинної біомаси *Corynebacterium glutamicum* від ферментату. Для цього застосовують відцентровий сепаратор ГФ 20 для поділу клітинної біомаси і культуральної рідини моделі MMPX 404 SGP (Альфа Лаваль). Сепаратор має високу швидкість обробки великих обсягів, забезпечує надійність і стабільність процесу. Сепаратор працює у безперервному режимі, що забезпечує високу продуктивність і ефективність відділення біомаси, мінімізуючи втрати продукту, а також полегшується збереження стерильності.

Безпосередньо з ферментера культуральну рідину не подають одразу на сепаратор без попередньої підготовки. Для забезпечення ефективної сепарації потрібна стабільна подача з регульованим потоком і певною концентрацією клітин, тому культуральну рідину об'ємом 3125 л спочатку перевантажують у збірник З 19, який працює як буферний бак для вирівнювання потоку та регулювання температури.

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
						45
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Для сепарування культуральної рідини *Corynebacterium glutamicum* оптимальна температура становить близько 20–25 °С. Такий температурний режим забезпечує стабільність біомаси, знижує ризик денатурації білків і зберігає фізико-хімічні властивості продукту, водночас полегшуючи процес сепарації. Підвищення температури вище 30 °С може негативно впливати на якість біомаси та активність метаболітів.

Таким чином забезпечують поступову подачу культуральної рідини на сепаратор, щоб уникнути перевантаження і забезпечити оптимальну продуктивність обладнання.

Культуральна рідина надходить під тиском через вхідний трубопровід у сепаратор ГФ 20. На поверхні дисків сепаратора рідина утворює тонкий шар. При обертанні ротора клітини під дією відцентрової сили збираються на стінках барабана, відокремлюючись від рідини. Фугат, що містить гіалуронову кислоту, видаляється з сепаратору у збірник 3 21 для подальшого очищення та концентрування.

Біомаса збирається в збірник для утилізації.

Контролюють: швидкість обертання ротора, температуру рідини, тиск на вході (в межах 0,1–0,3 МПа). (К 5.1.1).

Отримують 2900 л фугату, який зі збірників 3 21 подають на операцію ТП 5.2. Ультрафільтрація.

Операція ТП 5.2. Ультрафільтрація.

Ультрафільтрація — це мембранний процес, який дозволяє концентрувати і очищати гіалуронову кислоту від низькомолекулярних домішок, білків та інших забруднень, зберігаючи при цьому високу молекулярну масу ГК.

Фугат (2900 л) подається на ультрафільтраційну установку Ф 22 зі збірників 3 21.

При проведенні ультрафільтрації мембрани з пористістю 0,02–0,03 мкм (ультрафільтраційні) затримують високомолекулярну ГК, пропускаючи низькомолекулярні речовини і воду. Процес ведеться при тиску 0,1–0,3 МПа

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		46

та температурі 20–30 °С для збереження властивостей ГК. Концентрат (ультрафільтрат) збирається в збірнику З 23.

Робота установки, режим промивання та регенерації мембран повністю автоматизований.

На операції контролюють масу концентрату (1000 л) за даними тензOMETричного датчику збірника З 23, тиск під час фільтрації (0,1–0,3 МПа), та температуру. (К 5.2.1, К 5.2.2)

Низькомолекулярні домішки і вода відводяться як пермеат на утилізацію.

Фільтрат для подальшої сушки у збірнику З 23 передають на операцію ТП 5.3. Сушка гіалуронової кислоти.

Операція ТП 5.3. Сушка гіалуронової кислоти.

Сушку концентрованого фільтрату культуральної рідини можна проводити кількома способами. При виборі способу сушки для виробництва ГК брали до уваги:

- розпилювальне сушіння — швидке, але може пошкоджувати молекули ГК через високі температури;
- вакуумне сушіння при низьких температурах менш ефективно, ніж сублімація, але кращий варіант, ніж конвекційне сушіння;
- сублімаційне сушіння проводиться при низьких температурах і вакуумі, що запобігає деградації ГК, вона зберігає високу молекулярну масу і функціональні властивості, утворюється сухий порошок з низькою залишковою вологістю (<1%).

Тому концентрований фільтрат культуральної рідини висушують способом ліофільної сушки, яку здійснюють в сушарці ГФ 24. Сушарка складається з камери для розміщення концентрату (з полицями для розподілу продукту), конденсатора льоду (охолоджувача), вакуумного насосу, панелі управління з сенсорним екраном, системи трубопроводів для відведення пари та подачі вакууму. Має зручний інтерфейс управління, який дозволяє точно налаштовувати необхідні параметри сублімації.

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		47

Концентрований фільтрат рівномірно розподіляють тонким шаром (2–5 мм) на піддонах, що вставляються в сушильну камеру.

Етапи сушки:

1. Заморожування концентрату — швидке охолодження до температури близько -45 ± 1 °С.
2. Сублімація (випаровування льоду під вакуумом) — при тиску 10–20 Па і температурі продукту 0–20 °С.
3. Досушування — видалення залишкової вологи при підвищеній температурі (до 35 ± 5 °С) і вакуумі.
4. Скидання вакууму та вивантаження.

Контролюють температуру, тиск, швидкість підвищення температури, тривалість сушки (24 ± 1 год) (К 5.3.1),

Після вивантаження висушену ГК збирають в збірник 3 25, контролюють зовнішній вигляд (білий або майже білий порошок, без запаху, без видимих сторонніх включень, однорідний, без грудочок), вологість висушеного продукту, молекулярну масу, чистоту, в'язкість, рН (К 5.3.2).

Порошок ГК передають на стадію ПМВ. 6. Пакування, маркування та відвантаження готового продукту.

Стадія ПМВ 6. Пакування, маркування та відвантаження готового продукту.

Операція ПМВ 6.1. Фасування та пакування гіалуронової кислоти.

ГК фасують у пляшки по 0,5 кг на машині для дозування та наповнення порошку ГФ 26.

Високоточна вібраційна машина для заповнення порошків в малих дозах в різні пляшки з кришкою. Обладнання калібрується разом з високоточними вагами для програмування швидкості обертання гвинта (шнек). Плинність порошку надається використанням коливальної активності в бункері. Для зручності є ножний привід. Оператор вручну вставляє порожні пляшки під носик для дозування.

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
						48
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Машину налаштовують на необхідну вагу – 0,5 кг. Контролюють під час роботи вагу в наповненій пляшці (має бути не менше 0,5 кг). Контролюють також якість закупорювання пляшки. Не має бути дефектів та перекосів кришок (К 6.1.1)

Оператор контролює під час фасування та укупорювання правильність інформації на етикетці. (К 6.1.2)

Наповнені пляшки збирають на накопичувальному столі, з якого вони потрапляють на стіл для упаковки ГФ 27. Пляшки вкладають в картонні ящики, які разом з груповою етикеткою відвантажуються на карантинний склад.

Контролюють якість маркування (чіткість та правильність номера серії та терміну придатності), якість пакування (К 6.1.3).

Відбирають пробу для контролю готової продукції за всіма показниками НТД. (К 6.1.4)

До отримання результатів контролю продукція зберігається на карантинному складі.

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
						49
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

3.4 Схеми виробництва (зі специфікацією обладнання)

Послідовність робіт з культурою мікроорганізму *Corynebacterium glutamicum* Cg-dR-CLS відображені у біологічній схемі виробництва продукту «Кислота гіалуронова високомолекулярна мікробного походження» в пляшках пластикових по 0,5 кг, яку наведено на рисунку 3.2.

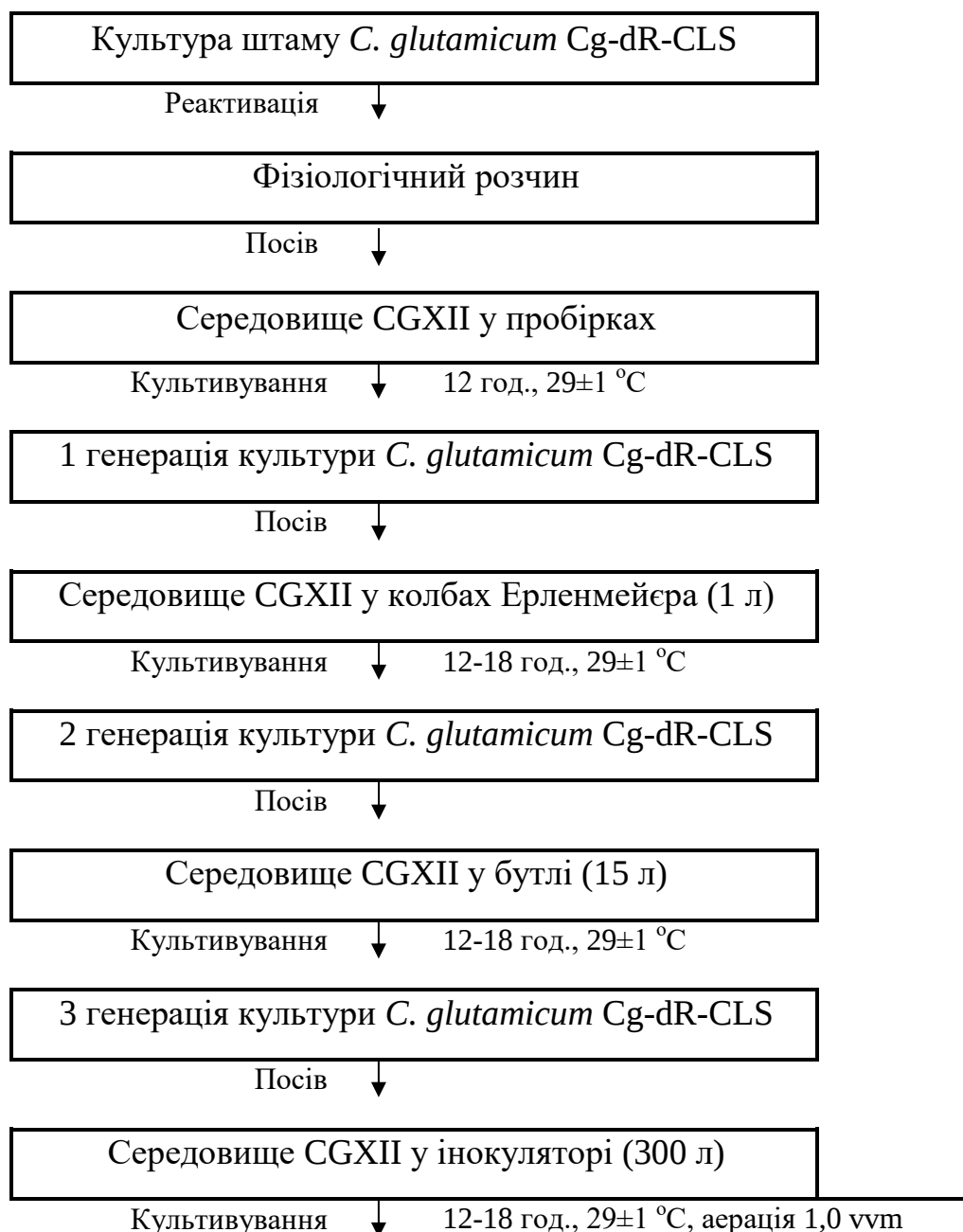
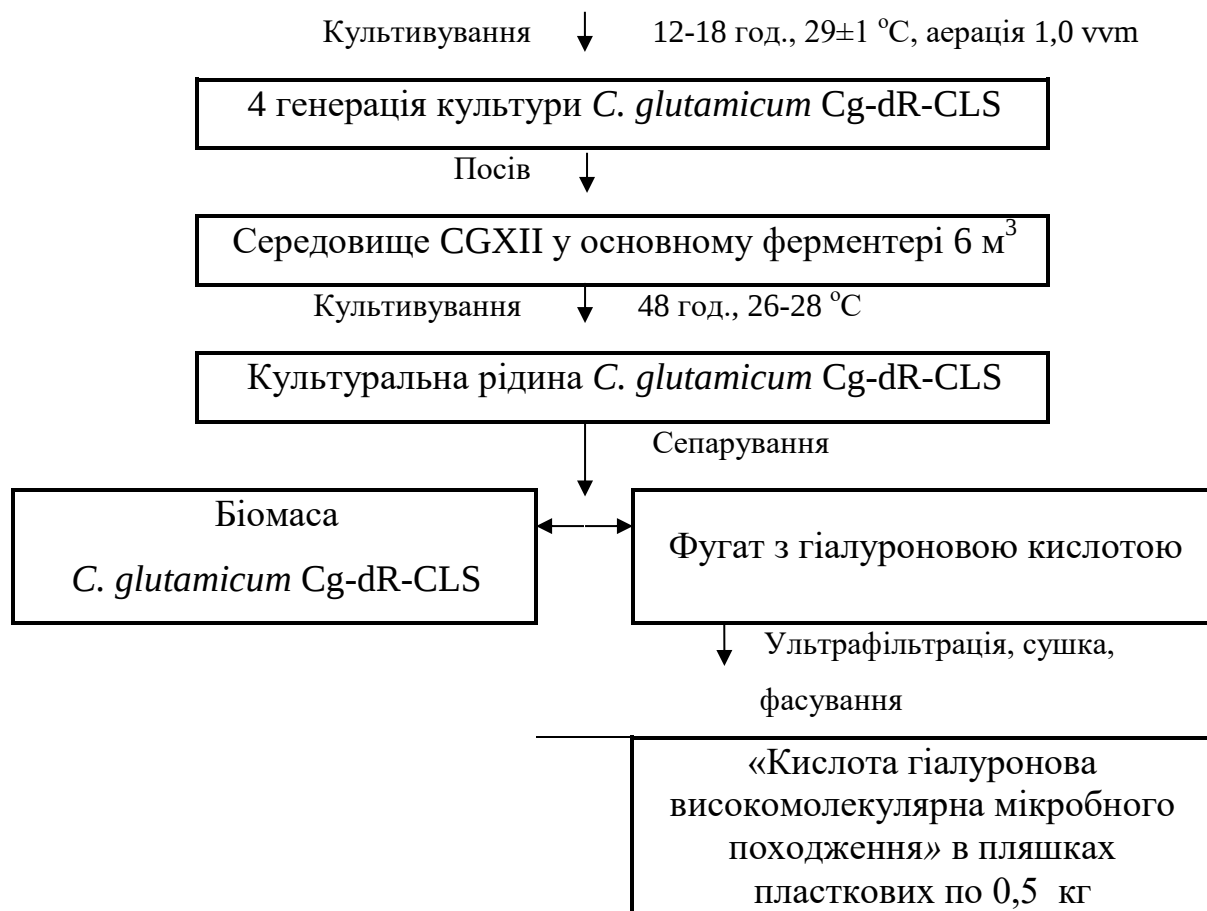


Рис 3.2 – Біологічна схема виробництва продукту «Кислота гіалуронова високомолекулярна мікробного походження» в пляшках пластикових по 0,5 кг.



Продовження рис 3.2 – продукту «Кислота гіалуронова високомолекулярна мікробного походження» в пляшках пласткових по 0,5 кг.

Технологічна схема виробництва продукту «Кислота гіалуронова високомолекулярна мікробного походження» в пляшках пласткових по 0,5 кг представлено на рис. 3.2.

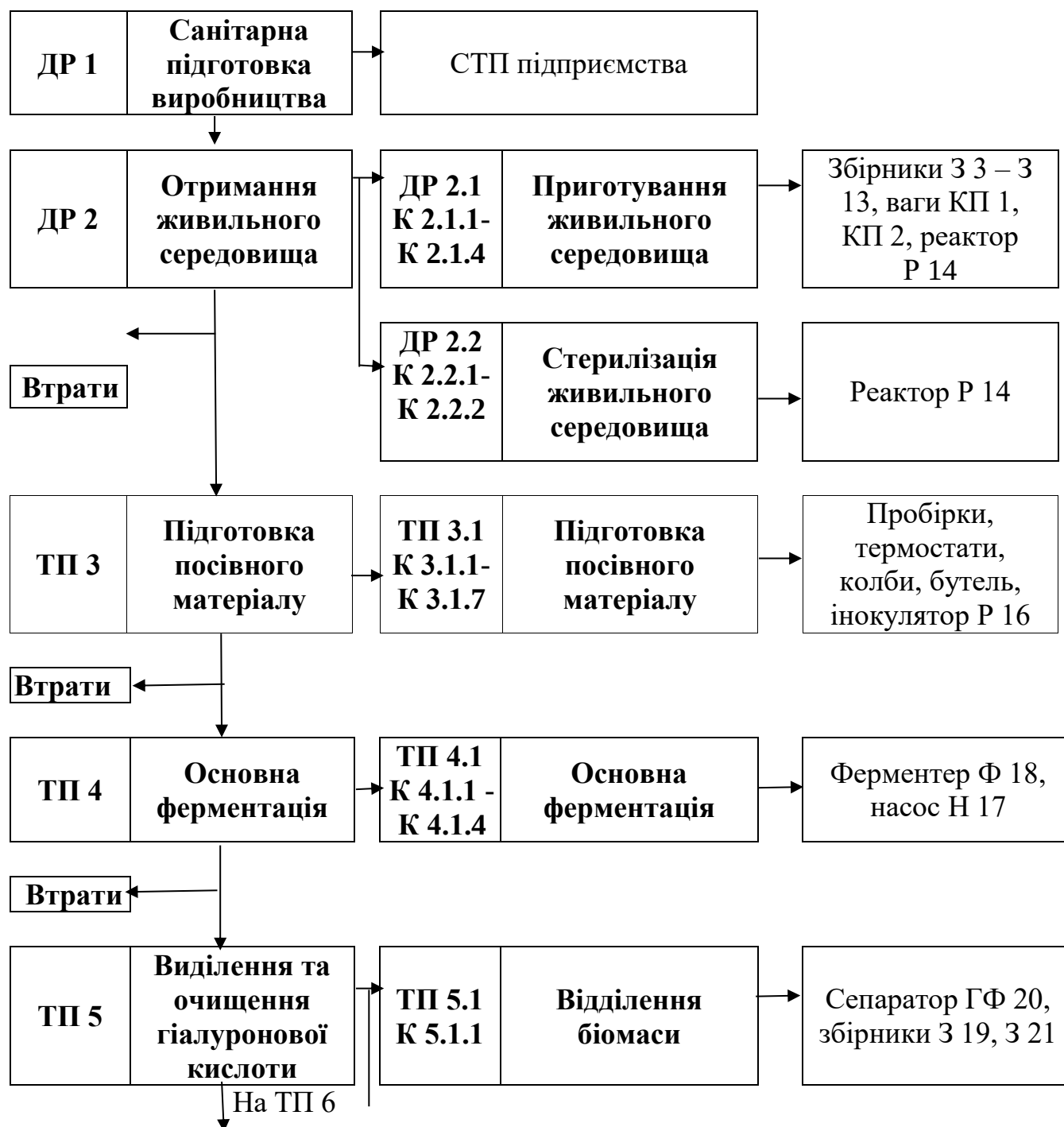
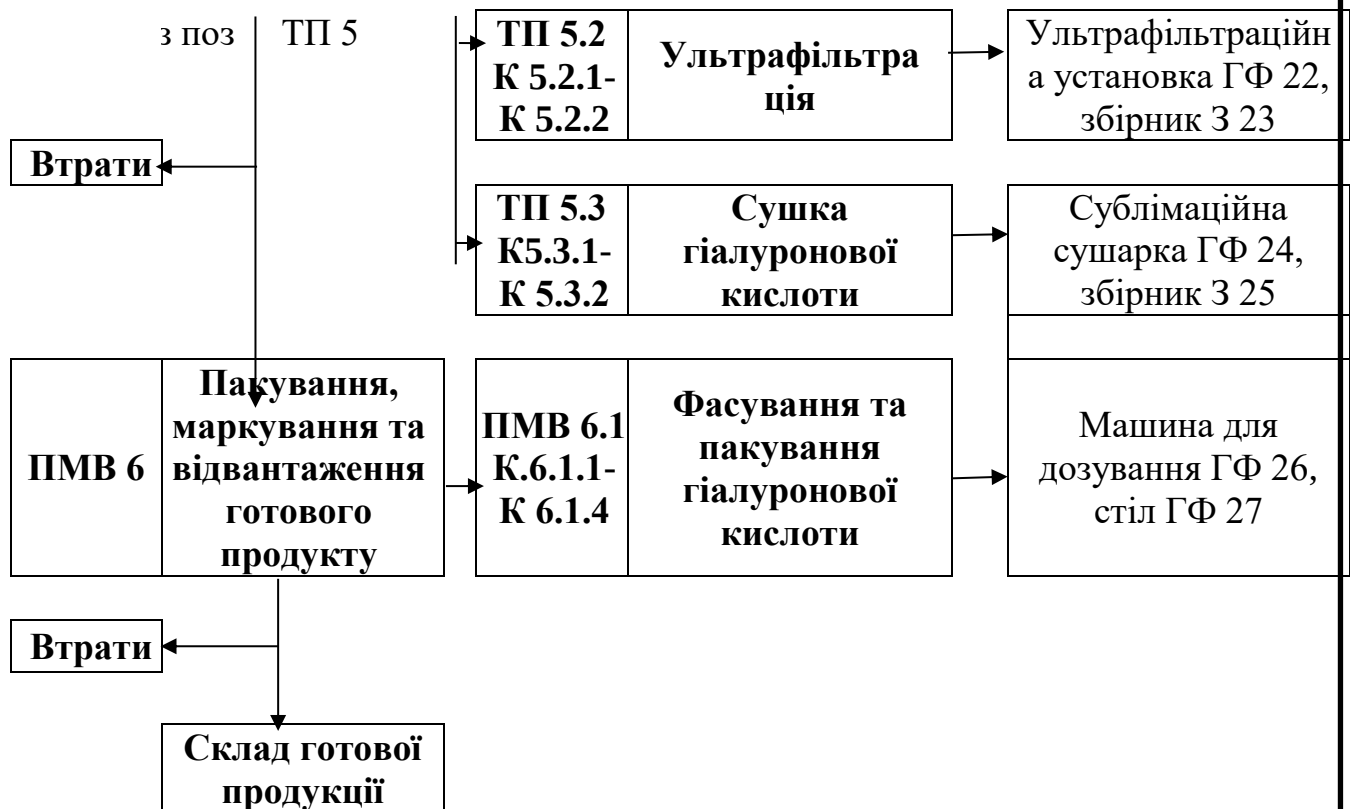


Рисунок 3.2 – Технологічна схема виробництва продукту «Кислота гіалуронова високомолекулярна мікробного походження» в пляшках пласткових по 0,5 кг.



Продовження рис. 3.2 – Технологічна схема виробництва продукту
«Кислота гіалуронова високомолекулярна мікробного походження» в
пляшках пластикових по 0,5 кг.

Апаратурну схему виробництва продукту «Кислота гіалуронова високомолекулярна мікробного походження» в пляшках пласткових по 0,5 кг наведено на рис. 3.3. [23, 28, 30]

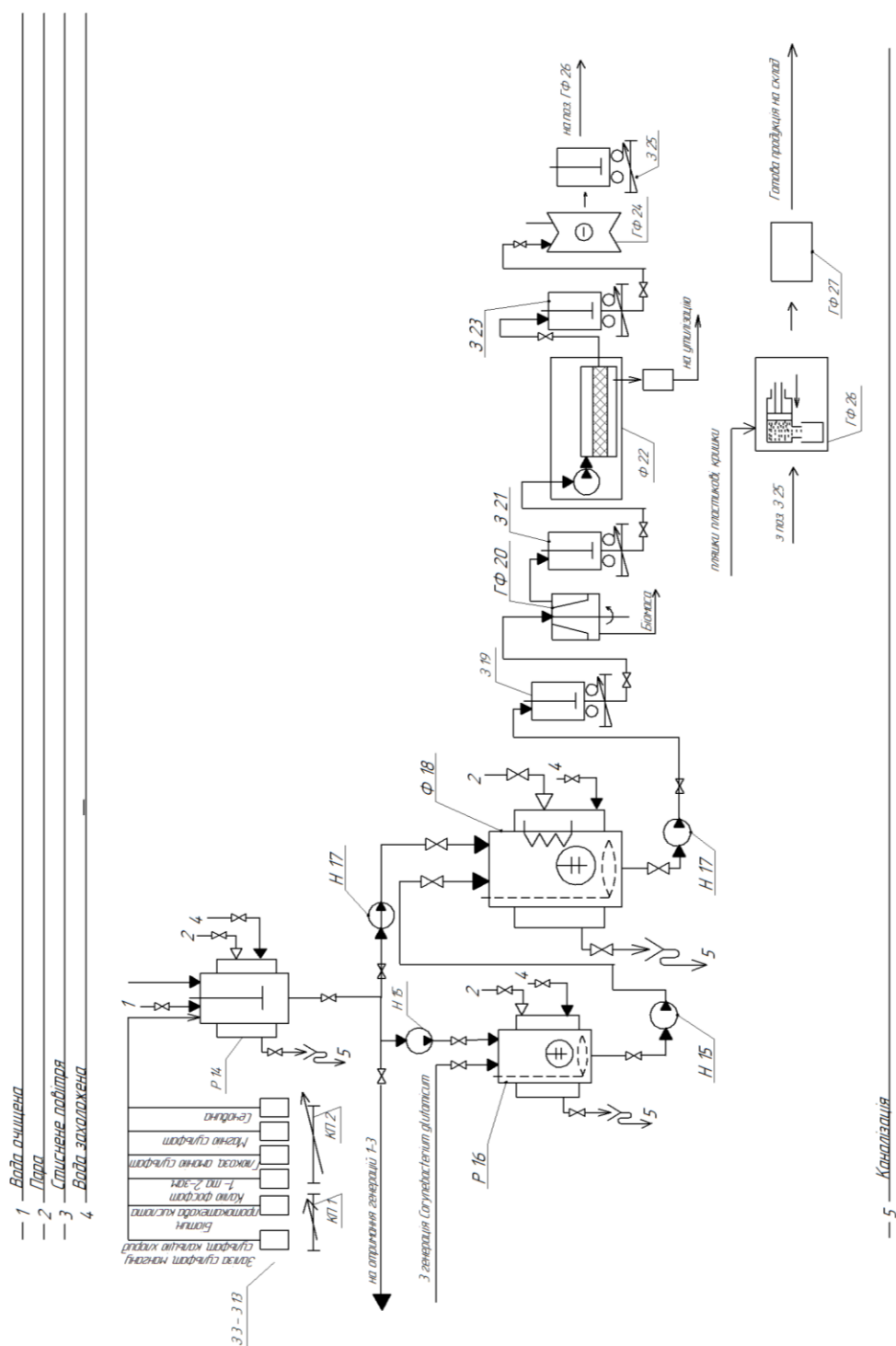


Рис. 3.3 – Апаратурна схема виробництва продукту «Кислота гіалуронова високомолекулярна мікробного походження» в пляшках пласткових по 0,5 кг.

Специфікація обладнання виробництва продукту «Кислота гіалуронова високомолекулярна мікробного походження» в пляшках пластових по 0,5 кг представлена у таблиці 3.4.

Таблиця 3.4 – Специфікація обладнання дільниці з виробництва продукту «Кислота гіалуронова високомолекулярна мікробного походження» в пляшках пластових по 0,5 кг

Поз.	Позначення	Найменування	Кільк.	Маса, кг	Примітка (матеріал)
1	2	3	4	5	6
КП 1	марка EP 613	Ваги лабораторні. Конструкція вагової чаші: кругла з вітрезахисною вітриною. Макс. розмір наважки: 610 г. Ціна поділки: 0,001 г. Клас точності: П. Виробник: «Ohaus», США.	1	0,3	н/сталь імп.316L, скло, пластик
КП 2	Grunhelm GSC-051	Ваги торгівельні з РК-дисплеєм. Найбільша границя зважування 50 кг. Дискретність 5 г. Потужність 0,25 Вт. Розмір платформи, мм 230х340. Габаритні розміри, мм: 260х367х119. Виробник: Китай.	1	3	Н/сталь AISI 304
3 3-3 8		Ємність для зважування. Посуд емальований. ГОСТ 471-81 (2,5,10,20,40 л)	15	1-2	скло
3 9-3 13		Ємність для зважування. Стакан лабораторний. Місткістю 100, 200 мл.	7		скло
Р 14	РС 4,0	Реактор. Емальований, з якірною мішалкою. Робочий об'єм, м ³ 4,0. Об'єм сорочки, м ³ 0,533. Потужність 5,5 кВт. Тиск, МПа у корпусі 0,3, у сорочці 0,6. Температура, °С від -20 до 250. Габаритні розміри, мм: діаметр 1750, висота 4115.	1	3545	Сталь, емаль

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
						55
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Продовження таблиці 3.4

1	2	3	4	5	6
		Виробник: фірма «Henan Wanda Chemical Equipment», Китай			
Н 15	T53	Насос. Пневматичний, з підпором. Продуктивність, л/хв. 60. Макс. напірний тиск, МПа 0,8. Габаритні розміри, мм: 150x159x190. Виробник: «Tapflo», Швеція	2	5,3	сталь AISI 316L
Р 16	ПФ-300	Інокулятор. Загальний об'єм 300 л, Робочий об'єм 210 л. Тиск, МПа 0,3 (ємність), 0,4 (сорочка). Температура макс. оС 143 (ємність), 151 (сорочка). Трирівнева мішалка з похилими лопатями, 3 приварені перегородки. Швидкість перемішування 30-700 об/хв. Габаритні розміри, мм: діаметр 800, висота 2578. Виробник: фірма «Henan Wanda Chemical Equipment», Китай	1	600	Н/сталь марки 316L (контакт із продуктом), 304L (не контактує із продуктом)
Н 17	ЦНСк 5-120	Насос відцентровий. Напір, м ³ /год: 5. Висота подачі, м: 120. Потужність двигуна, кВт: 7,5. Габаритні розміри, мм: 1010x250x290. Виробник: ООО «Гідравлік-М», Україна	1	64	Збірний
Ф 18	FXZ6.0	Ферментер. Загальний об'єм 6000 л, Робочий об'єм 4200 л. Тиск, МПа 0,25-0,5 (ємність), 0,3 (сорочка). Потужність мішалки 5,5 кВт. Габаритні розміри, мм: діаметр 1500, висота 4740. Виробник: фірма «Henan Wanda Chemical Equipment», Китай	1	8200	Н/сталь марки 316L (контакт із продуктом), 304L (не контактує із продуктом)
З 19	РУ2500 М	Збірник. Об'єм – 2500 л. Оснащений сорочкою, мішалкою, оглядовим люком, тензометричним пристроєм,	2	350	сталь AISI 316L

Продовження таблиці 3.4

1	2	3	4	5	6
		пересувний. Габаритні розміри: 1830×2020 мм. Виробник: «Patent Ltd», Угорщина			
ГФ 20	Модель MMPX 404 SGP	Сепаратор відцентровий. Габаритні розміри, мм: 800х600х1000. Швидкість обертання чаші, об/хв. 9800. Продуктивність 2900. Об'єм резервуару для шламу, л 32. Потужність двигуна, кВт 3. Виробник: Альфа-Лаваль, США.	1	250	Н/сталь марки 316L (контакт із продуктом), 304L (не контактує із продуктом)
З 21, З 23	Тип ZA- 1600L	Збірник. Об'єм, л 2000 (загальний, 1600 (робочий)). Робочий тиск в корпусі – до 0,2 МПа. Діаметр завантажувального люка – 400 мм. Діаметр вивантажувального патрубка – 50 мм. Габаритні розміри, мм: 1380×1300×3500. Виробник: фірма «Henan Wanda Chemical Equipment», Китай.	3	400	Сталь АІСІ 316L
Ф 22	UF 0,2	Ультрафільтраційна установка. Тип мембрани - порожниста волоконна. НОММ, кДа 300. Діаметр волокна, мм 1,66/1,0 або 2,4/1,2. Кількість модулів до 14. Номінальна площа, м ² 6. Максимальний тиск, МПа 0,3. Робочий тиск, МПа 0,02-0,08. Продуктивність, м ³ /год 1-3. Габаритні розміри, мм 980х500х1420. Виробник: компанія «Oxumo Technology», Китай	1	160	н/сталь 316L, полісульфо н
ГФ 24	VirTis 1000-12	Сублімаційна сушарка. Кількість полиць: до 15, кліренс: 75 мм, площа загальна, м ² : 13,38 кв.м. Точність	1	1350	Н/сталь марки 316L (контакт із продуктом),

Продовження таблиці 3.4

1	2	3	4	5	6
		регулювання температури полки: ± 1 °С. Об'єм конденсора ліофільної сушарки - 100 л, температура конденсора -70 °С. Продуктивність за льодом 100 кг/цикл. Розмір полиці, мм: 916x1220. Габаритні розміри: 1750x2550x2150 мм. Виробник: VirTis Benchmark Production			304L (не контактує із продуктом)
З 25	ПВ- 160А	Збірник пересувний. Ємність 160 л, оснащена відкидною кришкою, знімною мішалкою швидкістю 0-1000 об/хв, тензометричним ваговимірювальним електронним пристроєм (ТВЕП). Габаритні розміри, мм: 530x320x240. Виробник: «Промвіт», Україна	2	65	Н/сталь 12Х18Н10Т
ГФ 26	FR-60	Машина для дозування та наповнення порошку. Метод вимірювання: вібраційни шнек. Об'єм бункера, л 20. Система управління ЖК-монітор. Діапазон вимірювання, г 1-500. Точність дозування: $\pm 2\%$. Продуктивність, пляшок/хв. 20- 40. Потужність, кВт 0,5. Габаритні розміри, мм: 800мм x 1200мм x 1650мм. Виробник: фірма «VKPAK», Китай.	1	150	н/сталь SS 304L
ГФ 27		Стіл для упаковки. Габаритні розміри, мм: 2300x1000x800. Нестандартне обладнання.	3	15	збірний

3.5 Критичні параметри виробництва

Таблиця 3.6 – Контроль критичних стадій і проміжної продукції виробництва продукту «Кислота гіалуронова високомолекулярна мікробного походження» в пляшках пластикових по 0,5 кг

Номер	Критичні точки (критичні стадії, операції)	Критичні параметри і критичні характеристики якості	Одиниця виміру	Критерій прийнятності
1	2	3	4	5
К 1.1.	Стадія ДР 1. Санітарна підготовка виробництва	Підготовка виробничих приміщень класів С та D: -мікробна контамінація повітря робочої зони	КУО/м ³	C – ≤100 D – ≤ 200 [26, 27]
	Те ж	- максимально-допустиме число часток в 1 м ³ повітря	шт.	[26, 27]
К 1.2	Те ж	Підготовка обладнання і інвентарю (класи С та D): - мікробіологічна контамінація поверхонь	КУО/м ³ /пластина	C – ≤ 25 D – ≤ 50 [26, 27]
К 1.3	Те ж	Підготовка технологічного одягу (класи С та D): - мікробіологічна контамінація	КУО/м ³ /пластина	C – ≤ 25 D – ≤ 50 [26, 27]
К 2.1.1	Стадія ДР 2. Приготування живильного середовища	Вхідний контроль сировини: - всі показники за НТД		Відповідає вимогам
К 2.1.2	Те ж	Наважки сировини: - глюкози - амонію сульфату - сечовини - калію фосфату однозаміщеного - калію фосфату двозаміщеного - магнію сульфату - кальцію хлориду - заліза сульфату - мангану сульфату - біотину	кг	68,00 68,00 17,00 3,40 3,40 0,85 0,034 0,034 0,034 0,00068

Продовження таблиці 3.6

1	2	3	4	5
		- протокатехової кислоти		0,102
К 2.1.3 К 2.1.4	Те ж	Середовище приготоване: - об'єм - рН	л	3400 7,0±0,2
К 2.2.1	Те ж	Режим стерилізації: - температура - тривалість - тиск - температура охолодження	°С год МПа °С	121 20 0,1 30
К 2.2.2	Те ж	Середовище стерилізоване: - стерильність		Стерильне
К 3.1.1	Стадія ТП 3. Підготовка посівного матеріалу	Режим інкубації 1 генерації: - температура - тривалість	°С год.	30 12
К 3.1.2	Те ж	Контроль 1 генерації: - чистоту - життєздатність і концентрація клітин - фізіологічний стан - рН - температура - концентрація глюкози - ендотоксини і токсини	°С г/л	відсутність контамінантів OD600 3-5 активність гіалуронан- синтази, відсутність спорових форм і клітин з аномальною морфологією 6,5–7,5 28–30 10-15 відсутність
К 3.1.3	Те ж	Режим інкубації 2 генерації: - температура - тривалість - аерація (перемішування)	°С год. об/хв	30 12-18 200-250
К 3.1.4	Те ж	Контроль 2 генерації: См. К 3.1.2		См. К 3.1.2
К 3.1.5	Те ж	Об'єм для 3 генерації: - живильного середовища - інокуляту	л	8 0,4

Продовження таблиці 3.6

1	2	3	4	5
К 3.1.6	Те ж	Контроль 3 генерації: См. К 3.1.2		См. К 3.1.2
К 3.1.7	Те ж	Об'єм для 4 генерації: - живильного середовища - інокуляту - аерація	л л vvm	160 8
К 3.1.8	Те ж	Контроль 4 генерації: См. К 3.1.2		См. К 3.1.2
К 4.1.1	Стадія ТП 4. Основна ферментація	Живильне середовище на завантаженні - температура - об'єм	°C л	28-32 3125
К 4.1.2	Те ж	Кількість інокуляту	л	160
К 4.1.3	Те ж	Режим культивування: - температура - тривалість - аерація - рН - вміст глюкози	°C год. vvm г/л	28-30 60 1 7,2±0,2 8-15
К 4.1.4	Те ж	Контроль завершення культивування: - тривалість - в'язкість - концентрація ГК	год мПа·с г/л	60±2 1,18 32
К 5.1.1	Стадія ТП 5. Виділення та очищення та гіалуронової кислоти	Режим сепарування: - швидкість обертання ротора - температура - тиск на вході	об/хв. °C МПа	9800 20-25 0,1-0,3
К 5.2.1	Те ж	Об'єм концентрату	л	1000
К 5.2.2	Те ж	Тиск	МПа	0,1-0,3
К 5.3.1	Те ж	Режим сушки: - температура охолодження - температура сублімації - тиск - температура досушування - тривалість	°C °C Па °C год	-45±1 0-20 10-20 35±5 24±1
К 5.3.2	Те ж	Контроль проміжного продукту (порошок ГК): - зовнішній вигляд		білий або майже білий

		- вологість - молекулярна маса - в'язкість - рН	% кДа мПа·с	порошок, без запаху, без видимих сторонніх включень, однорідний, без грудочок не більше $10 > 1,0 \times 10^6$ > 1000 6,0-7,5
К 6.1.1	Стадія ПМВ 6. Пакування, маркування та відвантажен ня готового продукту	Вага наповнення пляшки Якість закупорювання	кг	Не менше 0,5 Відсутні дефекти та перекуси кришок
К 6.1.2	Те ж	Якість етикетування		інформація на етикетці правильна
К 6.1.3	Те ж	Якість пакування та маркування		чіткість та правильність номера серії та терміну придатності, відсутність дефектів
К 6.1.4	Те ж	Готова продукція: «Кислота гіалуронова висо- комолекулярна мікробного походження» в пляшках пласткових по 0,5 кг		Відповідніст ь всіх показників вимогам НТД

3.6 Екологічні аспекти виробництва

Виробництво гіалуронової кислоти мікробним синтезом є сучасною і перспективною біотехнологією, що має значні переваги з точки зору екологічної безпеки порівняно з традиційними методами отримання ГК з тваринних джерел або токсигенних бактерій. Нами розглянуто основні

екологічні аспекти, які роблять мікробне виробництво ГК більш сталим, безпечним і ефективним.

1. Відсутність використання тваринної сировини

Традиційні методи отримання гіалуронової кислоти базувалися на екстракції з півнячих гребенів або склоподібного тіла великої рогатої худоби. Цей підхід пов'язаний із численними екологічними і етичними проблемами: необхідність забою тварин, високі витрати на утримання, а також ризик передачі зоонозних інфекцій і забруднення продукту білками тваринного походження.

Мікробний синтез ГК, зокрема за допомогою безпечних штамів *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus subtilis* або генетично модифікованих *Streptococcus* spp., дозволяє повністю відмовитися від тваринної сировини. Це значно знижує екологічний слід виробництва, усуває етичні дилеми і зменшує ризики забруднення продукту. [15, 16, 19]

2. Використання відновлюваних і недорогих субстратів

Мікробне виробництво ГК базується на ферментації, де джерелом вуглецю служать органічні речовини — переважно глюкоза, сахароза, кукурудзяний сироп, або навіть аграрні відходи (цукровий буряк, кукурудзяні стебла, пшеничні висівки). Використання таких субстратів сприяє замкненню біологічних циклів і зменшує залежність від викопних ресурсів.

Крім того, розвиток технологій метаболічного інженерування дозволяє створювати штами мікроорганізмів, здатних ефективно переробляти альтернативні, недорогі та екологічно безпечні субстрати, що підвищує стійкість і економічність виробництва. [12, 20, 29]

3. Зниження обсягів відходів і забруднень

Ферментаційні процеси, особливо на основі *Corynebacterium glutamicum*, характеризуються високою селективністю і виходом цільового продукту, що зменшує кількість побічних продуктів і відходів.

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		63

Відходи, що утворюються, мають переважно органічне походження і можуть бути утилізовані або перероблені біотехнологічними методами (наприклад, анаеробним бродінням для отримання біогазу).

Також сучасні методи очищення, такі як ультрафільтрація, електрофільтрація та мембранні технології, дозволяють мінімізувати використання хімічних реагентів і водних ресурсів, знижуючи екологічний вплив. [3, 15, 20]

4. Енергетична ефективність і оптимізація процесів

Виробництво ГК за допомогою мікробного синтезу може бути оптимізоване для зниження енергоспоживання. Наприклад, застосування штамів з підвищеною аерабільністю (введення гена *Vitreoscilla* гемоглобіну), використання технологій fed-batch ферментації, а також автоматизованих систем контролю параметрів процесу дозволяють підтримувати оптимальні умови росту і продукції при мінімальних енергетичних затратах.

Крім того, сучасні установки для сушіння (ліофільні сушарки з рекуперацією тепла) і мембранні системи очищення сприяють зниженню загальних енергетичних витрат виробництва. [3, 10, 12, 30]

5. Безпека і відсутність токсичних компонентів

Використання безпечних штамів мікроорганізмів, таких як *Corynebacterium glutamicum* (статус GRAS), виключає ризики токсичності і забруднення продукту бактеріальними токсинами, що характерно для традиційних стрептококових виробництв.

Це знижує потребу у складних і енерговитратних стадіях очищення, а також зменшує екологічне навантаження на навколишнє середовище. [1, 10, 12]

6. Перспективи сталого розвитку і «зеленої» хімії

Мікробне виробництво гіалуронової кислоти відповідає принципам зеленої хімії і сталого розвитку, оскільки базується на біологічних процесах, відновлюваних ресурсах, мінімізації відходів і небезпечних речовин.

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
						64
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Впровадження таких технологій сприяє зниженню викидів парникових газів, зменшенню забруднення водних і ґрунтових ресурсів, а також створює умови для виробництва біорозкладних і безпечних матеріалів.

Отже, виробництво гіалуронової кислоти мікробним синтезом є екологічно доцільним і стійким процесом, що дозволяє уникнути багатьох проблем, пов'язаних з традиційними методами отримання ГК. Використання безпечних мікроорганізмів, відновлюваних субстратів, сучасних технологій ферментації та очищення забезпечує мінімальний екологічний вплив, високу якість продукту і економічну ефективність. Ці фактори роблять мікробний синтез гіалуронової кислоти перспективним напрямом для розвитку біотехнологічної промисловості у світі.

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
						65
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ВИСНОВОК

1. Проведено огляд структури та властивостей гіалуронової кислоти та джерел її отримання.
2. Проаналізовано зарубіжні та вітчизняні наукові публікації, що стосуються методів отримання глікозаміногліканів (зокрема ГК) мікробним синтезом та їх оптимізації.
3. З'ясовано коло перспективних продуцентів глютамінової кислоти та зроблено вибір мікроорганізму для його використання в технологічному процесі - *Corynebacterium glutamicum*.
4. Проаналізовано особливості культивування продуценту та асортимент живильних середовищ для його промислового культивування.
5. Запропоновано організацію виробництва гіалуронової кислоти на виробничих потужностях одного з вітчизняних підприємств.
6. Проаналізовано наявне на ринку технологічне обладнання для організації процесу мікробного синтезу гіалуронової кислоти, обґрунтовано вибір апаратів.
7. Проведені технологічні розрахунки щодо сировини та обладнання для технологічного процесу отримання серії кислоти гіалуронової високомолекулярної.

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
						66
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Becker J., Christoph W. Industrial Microorganisms: *Corynebacterium glutamicum*. 2016. DOI: 10.1002/9783527807796.ch6.
2. Cheng F., Yu H., Stephanopoulos G. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for high-titer biosynthesis of hyaluronic acid. *Metabolic Engineering*. 2019. Vol. 55. P. 276–289. DOI: 10.1016/j.ymben.2019.07.003.
3. Electrofiltration improves dead-end filtration of hyaluronic acid and presents an alternative downstream processing step that overcomes technological challenges of conventional methods / G. Gözke et al. *Eng. Life Sci.* 2017. Vol. 17(9). P. 970–975. DOI: 10.1002/elsc.201600236.
4. Eliminating the capsule-like layer to promote glucose uptake for hyaluronan production by engineered *Corynebacterium glutamicum* / Y. Wang et al. *Nat. Commun.* 2020. Vol. 11. P. 3120. DOI: 10.1038/s41467-020-16962-7.
5. Enhanced Biosynthesis of Hyaluronic Acid Using Engineered *Corynebacterium glutamicum* Via Metabolic Pathway Regulation / F. Cheng et al. *Biotechnology journal*. 2017. Vol. 12(10). DOI: 10.1002/biot.201700191.
6. Fine-tuning the cell morphology of *Corynebacterium glutamicum* via dual-valve regulation for enhanced hyaluronic acid production / Y. Shuting et al. *Biotechnology Notes*. 2023. Vol. 4. P. 135–145. DOI: 10.1016/j.biotno.2023.12.003.
7. Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms / J. D. de Oliveira et al. *Microb. Cell. Fact.* 2016. Vol. 15. P. 119. DOI: 10.1186/s12934-016-0517-4.
8. Heterologous Hyaluronic Acid Production in *Kluyveromyces lactis* / A. M. Gomes et al. *Microorganisms*. 2019. Vol. 7(9). P. 294. DOI: 10.3390/microorganisms7090294.
9. Hoffmann J., Altenbuchner J. Hyaluronic acid production with *Corynebacterium glutamicum*: effect of media composition on yield and

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		67

molecular weight. *Journal of Applied Microbiology*. 2014. Vol. 117(3). P. 663–678. DOI: 10.1111/jam.12553.

10. Indirect Pathway Metabolic Engineering Strategies for Enhanced Biosynthesis of Hyaluronic Acid in Engineered *Corynebacterium glutamicum* / Y. Du et al. *Front Bioeng. Biotechnol.* 2021. Vol. 9. P. 768490. DOI: 10.3389/fbioe.2021.768490.
11. Media optimization in the RoboLector platform for enhanced protein production using *C. glutamicum*. Beckman Coulter Application Notes. URL: <https://www.beckman.fr/resources/reading-material/application-notes/media-optimization-in-the-robolector-pro-for-enhanced-protein-production-using-c-glutamicum> (Date of access: 02.02.2025).
12. Microbial Hyaluronic Acid Production: A Review / M. Serra et al. *Molecules*. 2023. Vol. 28(5). P. 2084. DOI: 10.3390/molecules28052084.
13. Production of isotopically enriched high molecular weight hyaluronic acid and characterization by solid-state NMR / P. Rampratap et al. *Carbohydrate Polymers*. 2023. Vol. 316. P. 121063. DOI: 10.1016/j.carbpol.2023.121063.
14. Properties, bioactive potential and extraction processes of glycosaminoglycans: an overview / E. Balbinot-Alfaro et al. *Ciência Rural*. 2021. Vol. 51(7). DOI: 10.1590/0103-8478cr20200821.
15. Techno-economic analysis of a hyaluronic acid production process utilizing streptococcal fermentation / R. G. Ferreira et al. *Processes*. 2021. Vol. 9. P. 241. DOI: 10.3390/pr9020241.
16. Буценко Л. М., Пенчук Ю. М., Пирог Т. П. Технології мікробного синтезу лікарських засобів : навч. посіб. Київ : НУХТ, 2009. 177 с.
17. Гіалуронова кислота – джерело краси та молодості. 20.11.2023. URL: <https://biovit.ua/ua/news/body-care/gialuronovaya-kislota-v-kosmetologii> (дата звернення: 15.04.2025).
18. Гіалуронова кислота в косметології. *Medik8 в Україні*. 14.03.2024. URL: <https://surl.li/trzkxn> (дата звернення: 15.04.2025).

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		68

- 19.Гіалуронова кислота. *Вікіпедія*. URL: <https://surl.li/mhlutd> (дата звернення: 15.04.2025).
- 20.Грищенко М. І., Старовойтова С. О. Економічні, технологічні та нормативні аспекти глікозаміногліканів біотехнологічного походження в сучасній косметології. *Наукові праці НУХТ*. 2024. Т. 30, № 1. С. 51–67. URL: <https://dspace.nuft.edu.ua/handle/123456789/41932> (дата звернення: 15.04.2025).
- 21.Державна Фармакопея України. Доповнення 2 / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-ге вид. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2018. 336 с.
- 22.ДСТУ ISO 22000:2019. Системи керування безпечністю харчових продуктів. Вимоги до будь-яких організацій в харчовому ланцюзі (ISO 22000: 2018, IDT). На заміну ДСТУ ISO 22000:2007 ; чинний від 2019-10-31. Київ : УкрНДНЦ, 2019. 39 с.
- 23.ДСТУ ГОСТ 2.612:2014. Єдина система конструкторської документації. Електронний формуляр. Загальні вимоги. (ГОСТ 2.612-2011, IDT). Офіц. вид. Вперше ; чинний від 2014-11-01. Київ : Мінекономрозвитку України, 2014. 47 с.
- 24.Кислота гіалуронова. *Фармацевтична енциклопедія*. URL: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/6530/kislota-gialuronova> (дата звернення: 15.04.2025).
- 25.Лич І. В., Угрин А. О., Волошина І. М. Гіалуронова кислота: біосинтез та використання. *Український біофармацевтичний журнал*. 2019. № 2(59). С. 6–13. DOI: 10.24959/ubphj.19.212.
- 26.Лікарські засоби. Належна виробнича практика : Настанова СТ–Н МОЗУ 42-4.0:2020 / розроб.: ДНУ «НТК «Інститут монокристалів» НАН України». Вид. офіц. Київ : МОЗ України, 2020. 356 с.
- 27.Лікарські засоби. Належна виробнича практика. Дод. 1. Виробництво стерильних лікарських засобів : Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.0/1:2023 /

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		69

розроб.: ДНУ «НТК «Інститут монокристалів» НАН України». Вид.
офіц. Київ : МОЗ України, 2023. 89 с.

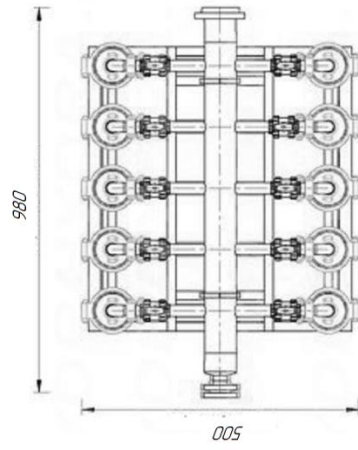
28.Методичні рекомендації до виконання кваліфікаційної роботи бакалавра
для здобувачів вищої освіти спеціальності 162 «Біотехнології та
біоінженерія» ОП «Біотехнологія» / О. С. Калюжная та ін. Харків :
НФаУ, 2024. 128 с.

29.Рядних А. С. Альтернативні субстрати для виробництва гіалуронової
кислоти мікробним синтезом. *Актуальні питання створення нових
лікарських засобів* : матеріали XXXI Міжнар. наук.-практ. конф.
молодих вчених та студентів, м. Харків, 23-25 квіт. 2025 р. Харків :
НФаУ, 2025. С. 188–189.

30.Сидоров І. Ю., Влязло Р. І., Новіков В. П. Процеси і апарати
мікробіологічних виробництв : підручник. Харків : ХНФаМ, 2020. 256 с.

					162.01.17.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		70

ДОДАТКИ



Характеристика приладу

Годовая стоимость, руб./год	1-3	периоды доставки
Топливо	30	
АКПП	166/10	
Двигатель бензиновый ММ	20/4	
Аккумулятор	6	
Амортизаторы перед. М2	1	
Амортизаторы зад. М4	172/118	
Двигатель бензиновый ММ	900/500/4,23	
Мотор	60	
Вспомог.	двигатель бензиновый	
Вспомог.	двигатель	

[illegible]

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

**АКТУАЛЬНІ ПИТАННЯ СТВОРЕННЯ
НОВИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ**

МАТЕРІАЛИ
XXXI МІЖНАРОДНОЇ НАУКОВО-ПРАКТИЧНОЇ
КОНФЕРЕНЦІЇ МОЛОДИХ ВЧЕНИХ ТА СТУДЕНТІВ

23–25 квітня 2025 року
м. Харків

Харків
НФаУ
2025

АНАЛІЗ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПІДХОДІВ ДО КОРЕКЦІЇ СТАНІВ В ГЕРОНТОЛОГІЇ ТА ГЕРІАТРІЇ

Писарська А.І.

Науковий керівник: Філіпцова О.В.

Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна
philiptsova@yahoo.com

Вступ. Стрімкий розвиток біотехнологічних методів відкриває нові перспективи у боротьбі зі старінням та асоційованими захворюваннями, створюючи підґрунтя для формування персоналізованих стратегій профілактики вікових патологій. Сучасна геронтологія трансформується з дисципліни, зосередженої на симптоматичному лікуванні, у науку, здатну запропонувати методології активного втручання у процеси старіння на молекулярному рівні. Інноваційні підходи включають технології часткового клітинного репрограмування, маніпуляції з сигнальними шляхами регуляції метаболізму та використання сенолітиків для видалення сенесцентних клітин.

Мета дослідження. Метою дослідження було вивчення деяких біотехнологічних підходів до корекції станів при старінні та при хворобах старіння.

Матеріали та методи. Для дослідження було проведено аналітичний огляд наукових джерел.

Результати дослідження. Валідація біомаркерів старіння становить фундаментальну проблему для розробки ефективних геріатричних інтервенцій. Мультиомічні підходи дозволяють формувати інтегральні моделі біологічного віку, на основі яких можлива оцінка ефективності терапевтичних втручань. Епігенетичні годинники демонструють високу прогностичну цінність щодо визначення біологічного віку та залишкової тривалості життя. Мікробіомні дослідження виявляють критичну роль кишкової мікрофлори у модуляції процесів старіння через регуляцію запальних реакцій. Технології часткового клітинного репрограмування набувають особливого значення в контексті омолодження тканин. Фармакологічні інтервенції, що імітують ефекти обмеження калорій, демонструють потенціал у активації сиртуїнів та інших регуляторів метаболізму. Метформін, рапаміцин та спермідин розглядаються як перспективні геропротектори.

Висновки. Соціальні та психологічні аспекти геріатричної допомоги залишаються критично важливими для забезпечення якості життя літніх пацієнтів. Трансформація взаємовідносин між пацієнтами з деменцією та їхніми доглядачами відбувається в рамках складної динаміки, що потребує розуміння та підтримки з боку медичних працівників. Розробка протоколів психосоціальної підтримки, інтегрованих із біомедичними інтервенціями, представляє собою комплексний підхід до геріатричної допомоги.

АЛЬТЕРНАТИВНІ СУБСТРАТИ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ГІАЛУРОНОВОЇ КИСЛОТИ МІКРОБНИМ СИНТЕЗОМ

Рядних А.С.

Науковий керівник: Двінських Н.В.

Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна
begunova1203@gmail.com

Вступ. Мікробне виробництво гіалуронової кислоти (ГК) є областю досліджень, яка привертає увагу в останні роки через зростання попиту на цей біополімер в різних галузях

промисловості, в фармацевтиці та медицині. ГК за структурою відноситься до глікозаміногліканів лінійної форми, несультатованих. Це природний біополімер, який складається з повторюваних одиниць N-ацетилглюкозаміну та глюкуронової кислоти. ГК відіграє важливу роль у живих організмах і є перспективним біоматеріалом для різних застосувань завдяки своїм властивостям, як здатність утримувати зволоження, в'язкопружність, стійкість до механічних пошкоджень, відсутність імуногенності та токсичності. Тому організація промислового виробництва цієї сполуки є перспективним напрямом вітчизняної біотехнології, тому що саме мікробне виробництво гіалуронової кислоти є областю досліджень, яка привертає увагу в останні роки.

Мета дослідження. Аналіз складових живильних середовищ для оптимізації процесу отримання гіалуронової кислоти мікробним синтезом.

Матеріали та методи. Скринінг матеріалів зарубіжних та вітчизняних наукових публікацій, що стосуються оптимізації методів отримання глікозаміногліканів (зокрема ГК) мікробним синтезом з переважним акцентом на склад живильних середовищ, узагальнення інформації та формулювання висновків.

Результати дослідження. Традиційно культуральне середовище для виробництва гіалуронової кислоти базується на складних цукрах, таких як глюкоза та фруктоза, але вони занадто здорожують собівартість цільового продукту. Тому в наукових публікаціях досліджуються альтернативні джерела поживних речовин для культивування продуцентів ГК. Більш оптимальними дослідники визначають такі:

1. Сільськогосподарські відходи, такі як жом цукрових буряків, кукурудзяний розчин, пшеничні висівки, пептон овечої вовни тощо. Ці побічні продукти сільського господарства вважають придатними субстратами для виробництва ГК. Вони легкодоступні та мають додаткову перевагу, оскільки є екологічно чистими.
2. Промислові відходи, такі як барда лікєро-горілочних заводів, патока, сирна сироватка, казеїновий пептон та пептон тунця серед інших. Ці відходи часто дешевші, ніж традиційні субстрати, що робить їх привабливим варіантом для комерційного виробництва.
3. Синтетичні субстрати, такі як гідролізати крохмалю та целюлози. Ці субстрати відносно дешеві та прості у виробництві.

Загалом, були досліджені альтернативні джерела як субстрати для культуральних середовищ для виробництва гіалуронової кислоти, щоб знизити витрати на виробництво та зробити процес більш стійким. Хоча для повного розуміння потенціалу цих альтернативних джерел необхідні додаткові дослідження, вони пропонують багатообіцяючі можливості для майбутнього виробництва гіалуронової кислоти.

Висновки. Важливим завданням організації виробництва ГК мікробним синтезом в промислових масштабах є підтримка низької вартості виробництва. Для вирішення цієї проблеми досліджуються альтернативні складники культуральних середовищ, такі як сільськогосподарські відходи, промислові відходи та синтетичні субстрати, але найбільш відповідний субстрат буде залежати від використовуваних мікроорганізмів і масштабу виробництва.