

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

**Інститут (факультет) __ біотехнології та екологічного контролю __
Кафедра _____ біотехнології і мікробіології _____**

«До захисту в ЕК»

Директор інституту(декан
факультету)

_____ Наталія ГРЕГІРЧАК _____
(підпис) (ім'я та прізвище)

« » _____ червня 2025 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

_____ Віктор СТАБНИКОВ _____
(підпис) (ім'я та прізвище)

« » _____ червня 2025 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

зі спеціальності _____ 162 «Біотехнології та біоінженерія» _____
(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми _____ «Біотехнології: фармацевтична,
промислова, харчова, природоохоронна» _____

на тему: «Безвідходна технологія культивування *Streptococcus thermophilus*
для одержання гіалуронової кислоти»

Виконав: здобувач __ 4 __ курсу, групи __ 3 __

_____ КІРДА Анастасія Олексіївна _____
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник _____ СТАРОВОЙТОВА Світлана Олександрівна _____
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти _____
(ім'я та прізвище) (підпис)

_____ (ім'я та прізвище) (підпис)

_____ (ім'я та прізвище) (підпис)

Рецензент _____
(ім'я та прізвище) (підпис)

Я, як здобувачка Національного університету харчових технологій розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавала і не одержувала недозволеної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2025 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 01 ” березня 2024 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

КІРДИ Анастасії Олексіївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Безвідходна технологія культивування *Streptococcus thermophilus* для одержання гіалуронової кислоти

керівник роботи СТАРОВОЙТОВА Світлана Олександрівна, доц., к.б.н.,

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання) затверджені наказом

закладу вищої освіти від 29 березня 2025 року № 188-к

2. Строк подання здобувачем роботи 28 травня 2025 р.

3. Вихідні дані до роботи *Streptococcus thermophilus*, цільовий продукт: гіалуронова кислота

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)

Розділ 1. Характеристика гіалуронової кислоти; Розділ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента; Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування; Розділ 4.

Біосинтез *Streptococcus thermophilus*; Розділ 5. Обґрунтування вибору

технологічної схеми; Розділ 6. Специфікація обладнання; Розділ 7. Опис

технологічної схеми; Розділ 8. Виділення та очищення гіалуронової кислоти;

Розділ 9. Контроль виробництва

5. Перелік графічного матеріалу Технологічна схема ділянки виробничого біосинтезу – 1 аркуш формату А1; Апаратурна схема ділянки виробничого біосинтезу – 2 аркуші формату А1

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		Завдання видав	Завдання рийняв

7. Дата видачі

завдання 01.03.2025р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
Розділ 1. Характеристика гіалуронової кислоти	01.03.2025 – 14.03.2025	
Розділ 2. Обґрунтування вибору та характеристика <i>Streptococcus thermophilus</i>	15.03.2025 – 20.03.2025	
Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування	21.03.2025 – 30.03.2025	
Розділ 4. Біосинтез <i>Streptococcus thermophilus</i>	01.03.2025 – 10.03.2025	
Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	11.03.2025 – 20.03.2025	
Розділ 6. Специфікація обладнання	21.03.2025 – 28.03.2025	
Розділ 8. Виділення та очищення гіалуронової кислоти	11.04.2025 – 20.04.2025	
Розділ 9. Контроль виробництва	21.04.2025 – 31.04.2025	
Оформлення пояснювальної записки	01.05.2025 – 10.05.2025	
Виконання графічної частини роботи	11.05.2025 – 28.05.2025	
	01.03.2025 – 14.03.2025	

Здобувач

_____ (підпис)

_____ (ім'я та прізвище)

Керівник роботи

_____ (підпис)

_____ (ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці безвідходної та екологічно безпечної технології виробництва гіалуронової кислоти з використанням *Streptococcus thermophilus* як біологічного агента. Розроблено технологічну та апаратурну схеми біосинтезу, відповідно до яких гіалуронова кислота накопичується у культуральній рідині в процесі культивування.

Отриману біомасу *Streptococcus thermophilus*, яка має виражені пробіотичні властивості, запропоновано використовувати як цінну сировину для виробництва пробіотичних препаратів, біологічно активних добавок та функціональних харчових продуктів.

На основі розрахунків встановлено, що для забезпечення річної потреби необхідно синтезувати 16,2 кг гіалуронової кислоти. Вирощування посівного матеріалу та основний біосинтез передбачено здійснювати у ферментері об'ємом 500 л із коефіцієнтом заповнення 0,6.

У графічній частині представлені технологічна та апаратурна схеми (розміщені в додатках).

Запропонований підхід дозволяє реалізувати концепцію безвідходного виробництва з мінімальним екологічним навантаженням та одержанням додаткової цінної продукції для потреб фармацевтичної та харчової промисловості.

Загальний обсяг роботи – 112 сторінок, включаючи список використаних джерел та додатки. Робота містить 10 таблиць та 5 рисунків

Ключові слова: *Streptococcus thermophilus*, гіалуронова кислота, біосинтез, ферментер, технологічна схема, культивування

ABSTRACT

The qualification work is devoted to the development of a waste-free and environmentally friendly technology for the production of hyaluronic acid using *Streptococcus thermophilus* as a biological agent. The technological and hardware schemes of biosynthesis were developed, according to which hyaluronic acid accumulates in the culture liquid during the cultivation process.

The resulting biomass of *Streptococcus thermophilus*, which has pronounced probiotic properties, is proposed to be used as a valuable raw material for the production of probiotic preparations, biologically active additives, and functional foods.

Based on the calculations, it was found that 16.2 kg of hyaluronic acid should be synthesized to meet the annual demand. The cultivation of the seed and the main biosynthesis is planned to be carried out in a 500-liter fermenter with a filling factor of 0.6.

The graphical part presents the technological and hardware schemes (located in the appendices).

The proposed approach makes it possible to implement the concept of waste-free production with minimal environmental impact and obtain additional valuable products for the needs of the pharmaceutical and food industries.

The total volume of the work is 112 pages, including the list of references and appendices. The paper contains 10 tables and 5 figures

Keywords: *Streptococcus thermophilus*, hyaluronic acid, biosynthesis, fermenter, technological scheme, cultivation

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	4
ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ГІАЛУРОНОВОЇ КИСЛОТИ	10
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	13
2.1. Обґрунтування вибору <i>Streptococcus thermophilus</i>	13
2.2. Морфолого-культуральні ознаки.....	16
2.3. Фізіолого-біохімічні ознаки	18
2.4. Таксономічний статус біологічного агента.....	18
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	19
3.1. Потреба в гіалуронової кислоті	19
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	20
3.3. Розрахунок геометричного об'єму ферментера.....	23
3.4. Розрахунок кількості стадій отримання посівного матеріалу для ферментера 500	24
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS	28
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у <i>Streptococcus thermophilus</i>	28
4.2. Біотрансформація лактози у гіалуронову кислоту	30
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	34
5.1. Вибір способу культивування.....	34
5.2. Обґрунтування вибору ферментера	35
5.3. Обґрунтування підготовки повітря	36

5.3 Обґрунтування вибору мийчих засобів та дезінфектантів.....	38
5.4. Розрахунки витрат мийних та дезінфікуючих засобів.....	47
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	56
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	60
РОЗДІЛ 8. ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ГІАЛУРОНОВОЇ КИСЛОТИ.....	63
РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА.....	67
9.1. Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ	67
9.2. Мікробіологічний контроль культуральної рідини і чистоти культури.....	68
9.3. Показники росту <i>S. thermophilus</i> і синтезу гіалуронової кислоти.....	69
9.3.1. Визначення споживання джерела карбону (лактоза) у культуральній рідині	69
9.3.2. Визначення споживання азотного живлення (дріжджовий екстракт) у культуральній рідині.....	70
9.3.3. Визначення концентрації гіалуронової кислоти у культуральній рідині.....	72
9.3.4. Визначення концентрації біомаси	73
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	76
Додатки.....	84

ВСТУП

У сучасних умовах зростаючого екологічного навантаження та підвищеного попиту на біоактивні речовини особливого значення набуває впровадження сталих біотехнологій, які забезпечують високу ефективність, екологічну безпечність та безвідходність виробництва. Однією з таких речовин є гіалуронова кислота (ГК) — унікальний природний біополімер, що виконує важливі фізіологічні функції в організмі людини та широко використовується в медицині, фармації, косметології та офтальмології.

На тлі обмежень традиційних джерел отримання ГК з тваринної сировини, пов'язаних з етичними, технологічними та безпековими аспектами, дедалі актуальнішим стає мікробіологічний синтез з використанням GRAS-продуцентів. Серед них перспективним є молочнокислий мікроорганізм *Streptococcus thermophilus*, який дозволяє не лише отримувати гіалуронову кислоту з високими біологічними властивостями, а й формувати пробіотичну біомасу для подальшого використання у виробництві функціональних продуктів харчування та біологічно активних добавок.

Таким чином, реалізація концепції замкненого циклу виробництва — від ферментації до вторинного використання біомаси — забезпечує створення безвідходної біотехнологічної моделі, яка поєднує економічну доцільність та екологічну відповідальність.

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Вступ		
					Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Кірда А.О				8	2
Перевір.		Старовойтова С.О			Кафедра БТМ		
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					

Проблеми лікування захворювань суглобів, зокрема остеоартрозу, мають високу медико-соціальну значущість, адже істотно впливають на якість життя пацієнтів. Артроз належить до хронічних дегенеративно-дистрофічних захворювань, які супроводжуються руйнуванням хрящової тканини, болем та обмеженням рухливості. За даними ВООЗ, на остеоартроз страждає до 15% населення світу, і ця цифра зростає в умовах демографічного старіння [1].

Одним із найбільш перспективних напрямів лікування є застосування препаратів на основі гіалуронової кислоти. Завдяки здатності ГК відновлювати в'язкість синовіальної рідини, зменшувати запалення та стимулювати регенерацію хряща, внутрішньосуглобові ін'єкції демонструють високу терапевтичну ефективність, особливо на ранніх стадіях захворювання [2, 3].

З огляду на високу вартість імпортованих препаратів, організація локального виробництва ГК в Україні є не лише доцільною, а й стратегічно важливою. Це дозволить зменшити фінансове навантаження на пацієнтів, покращити доступність лікування та сприяти розвитку національного фармацевтичного сектору.

Крім того, біотехнологічне виробництво ГК із використанням безпечних мікроорганізмів відповідає принципам сталого розвитку та сприяє зниженню екологічного навантаження на довкілля.

Новизна проєкту полягає у використанні штаму *Streptococcus thermophilus* (видова назва не уточнена), здатного синтезувати до 0,598 г/л ГК за 18 год культивування, а також у реалізації інноваційної концепції безвідходного виробництва. Отримана біомаса застосовується у виготовленні пробіотичних і синбіотичних препаратів або функціональних продуктів харчування. Такий підхід не лише мінімізує обсяги відходів, а й забезпечує додаткову економічну ефективність, відповідаючи вимогам сучасної біоекономіки.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ГІАЛУРОНОВОЇ КИСЛОТИ

1.1. Гіалуронова кислота та її сфери застосування Гіалуронова кислота (ГК) — це природний полімер із високою молекулярною масою, який належить до групи нессульфатованих глікозаміногліканів. Її структура складається з повторюваних дисахаридних фрагментів — N-ацетилглюкозаміну та глюкуронової кислоти, які з'єднані β -1,3 та β -1,4-глікозидними зв'язками [3]. ГК є основним компонентом позаклітинного матриксу сполучної, епітеліальної та нервової тканин і виконує важливі функції у підтриманні їх цілісності та зволоженості [4].

Фізико-хімічні властивості: ГК має молекулярну масу в межах від 5 000 до 20 000 000 Да, залежно від джерела та методу виділення [5]. Розчинна у воді, вона формує в'язкі гідрогелі, здатні інтенсивно утримувати воду та підтримувати гідратацію тканин [3].

Біологічні функції:

- підтримка зволоженості та еластичності тканин [4];
- зниження тертя в суглобах завдяки мастильному ефекту [5];
- сприяння загоєнню ран та регенерації тканин [6];
- формування фізико-хімічного бар'єра проти патогенів [3].

Сфери застосування:

- **Ортопедія:** ін'єкції при артрозі для зменшення болю та покращення рухливості;
- **Офтальмологія:** в препаратах для зволоження та хірургічного використання [4];

					НУХТ БТЕК 04.03.21 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Кірда А.О			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Старовойтова С.О				11	3
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					

- **Косметологія та дерматологія:** креми, філери, біоревіталізація [6];
- **Стоматологія:** для лікування пародонтозу та післяопераційного відновлення [5].

1.2. Ефективність гіалуронової кислоти у лікуванні дегенеративних захворювань суглобів

Артроз (остеоартроз) є одним з найбільш поширених дегенеративних захворювань суглобів, що супроводжується поступовим руйнуванням хряща, зменшенням синовіальної рідини та виникненням болю [1]. Застосування ГК як природного компонента синовіальної рідини забезпечує:

- покращення мастильних властивостей суглоба;
- зниження запалення та больових відчуттів;
- стимуляцію регенерації хрящової тканини;
- покращення амортизації та рухливості суглоба.

Цей метод є загальноприйнятим у сучасній ортопедичній та ревматологічній практиці, оскільки поєднує ефективність і безпечність [6].

1.3. Потреба в гіалуронової кислоті для фармацевтичного використання За статистикою ВООЗ, артроз вражає до 15% населення планети. В Україні кожен третій громадянин має цю патологію, причому поширеність захворювання зростає з віком: 27% серед осіб старше 50 років і до 79% — після 60 років. Артроз — це хронічна дегенеративна патологія, яка призводить до деформації суглобів. Він уражає 10–12% населення, з переважанням серед жінок [1].

ГК є життєво необхідною для функціонування суглобів. При розвитку артрозу відбувається зниження її концентрації та молекулярної маси, що негативно впливає на механіку суглоба. Ін'єкції ГК покращують в'язкість синовіальної рідини, забезпечують хондропротекторний, протизапальний і знеболювальний ефекти, знижуючи апоптоз хондроцитів і активуючи регенерацію тканин [10].

ВООЗ включила внутрішньосуглобове введення ГК до рекомендацій з лікування остеоартрозу ще у 2003 році. Артроцентез (промивання суглоба) у поєднанні з ГК ефективно компенсує втрату синовіальної рідини та зменшує запалення [11].

У разі остеопорозу концентрація ГК також падає, що викликає тертя та пошкодження суглобових поверхонь. Терапія на основі ГК часто поєднується з консервативними методами: мазями, таблетками, ін'єкціями. Однак при зниженні ефективності цих засобів рекомендовано перейти на ін'єкції ГК [12]. Це дозволяє зменшити потребу в знеболювальних препаратах, уповільнити прогрес хвороби та уникнути хірургічного втручання [12].

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1. Обґрунтування вибору *Streptococcus thermophilus*

Ефективність культивування *Streptococcus thermophilus* залежить від низки параметрів: температури, рН, складу поживного середовища, рівня аерації, кислотності тощо. Правильно підібрані умови є запорукою високого виходу гіалуронової кислоти.

У таблиці 2.1 представлено якісний і кількісний склад поживного середовища, умови культивування, рівень біомаси та джерела літератури для різних штамів продуцентів. У таблиці 2.2 подано економічні розрахунки вартості компонентів середовищ для аналізованих бактерій-продуцентів пробіотиків.

За результатами розрахунків (табл. 2.3), штам *Streptococcus thermophilus* виявився найпродуктивнішим серед порівнюваних культур, що пояснюється низькою вартістю поживного середовища та високим рівнем синтезу цільового продукту.

					НУХТ БТЕК 04.03.21 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Кірда А.О.			РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Старовойтова С.О.					14	6
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Таблиця 2.1

Порівняльна характеристика штамів *Streptococcus thermophilus*

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація біомаси, КУО/мл, (концентрація ГК, г/л)	Умови культивування	Література
<i>Streptococcus thermophilus</i> *	Молочна сироватка – 450 мл/л Дріжджовий екстракт – 7,5 г/л Лактоза – 10 г/л	$1,02 \times 10^{10}$ (6,35 г/л) 0,598 г/л	24 год 40 °С рН 6,8 150 об/хв	Abbas Mohammed A., Niamah, A. K. (2022) Production and Optimization of Hyaluronic Acid Extracted from <i>Streptococcus thermophilus</i> Isolates. <i>Archives of Razi Institute</i> . 77(6): 2395–2405. https://doi.org/10.22092/ARI.2022.358612.2262
<i>Streptococcus thermophilus</i> **	Пептон – 0.75 Вода – 90 Дріжі – 0.75 глутамат натрію – 1 K ₂ HPO ₄ – 0.2 Твін 80 – 0.05 Томатний сік - 10	$1,91 \cdot 10^9$	рН 6,8; 42 °С 24 год	Chen, H., Bao, C., Li, C., Wan, H., & Shu, G. (2016). A box-behnken experimental design in the development of optimized medium for <i>Streptococcus thermophilus</i> . <i>Carpathian Journal of Food Science & Technology</i> , 8(2). P. 38-44
<i>Streptococcus thermophilus</i> ***	дріжджовий екстракт - 10 пептон - 10 ацетат натрію - 2 глутамат натрію - 2 K ₂ HPO ₄ - 2 Твін 80 - 1 MgSO ₄ - 0,25 MnSO ₄ - 0,05	$1,0 \times 10^{10}$	рН 6,8; 40 °С 24 год	Han M., Wu Y., Guo X. et al. (2022) Milk fermentation by monocultures or co-cultures of <i>Streptococcus thermophilus</i> strains. <i>Front. Bioeng. Biotechnol.</i> , 10 https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1097013

Розрахунок вартості поживного середовища

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1л середовища	
1	2	3	4	5	
<i>Streptococcus thermophilus</i> *	Молочна сироватка	4.5	10	0.045	
	Лактоза	10	120	1,2	
	Дріжджовий екстракт	7.5	1800	13,5	
	Вартість 1 л середовища – 14,75 грн				
<i>Streptococcus thermophilus</i> **	пептон	10	1120	11.2	
	Вода	90	90	1	
	K ₂ HPO ₄	0.02	607	12.14	
	глутамат натрію	1	180	0.36	
	Твін 80	0.05	317	0.317	
	Томатний сік	10	47	0.2	
	Дріжджі	0.75	52	0,01	
	Вартість 1 л середовища – 25.22 грн				
<i>Streptococcus thermophilus</i> ***	дріжджовий екстракт	10	1800	18	5
	пептон	10	1120	11.2	13
	ацетат натрію	2	90	0.18	14
	глутамат натрію	2	180	0.36	15
	K ₂ HPO ₄	2	607	12.14	16
	Твін 80	1	317	0.317	17
	MgSO ₄	0.25	100	0.025	7
	MnSO ₄	0.05	40	0.002	18
	Вартість 1 л середовища – 42.22 грн				

Умовна вартість біомаси, синтезованої на суміші ростових субстратів

Біологічний агент	Концентрація біомаси г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утворених біомаси за годину, г/л	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
1	2	3	4	5	6
<i>Streptococcus thermophilus</i> *	6,08	18	0,34	14.75	2.43
<i>Streptococcus thermophilus</i> **	5,8	24	0,24	25.22	4,35
<i>Streptococcus thermophilus</i> ***	6,23	24	0.26	42.22	6.78

Оскільки з літературного джерела [13] відомо, що для штаму *S. thermophilus** 102×10^8 КУО/мл відповідає 6,08 г/л біомасу. По цьому штаму зробимо приблизний перерахунок для всіх обраних штамів вихід КУО/мл в г/л виходячи з того, що кінцевим продуктом виробництва є закваска, одна доза якої містить

$$102 \times 10^8 \text{ КУО/мл} - 6,08 \text{ г/л}$$

$$1,91 \cdot 10^9 \text{ КУО/мл} - 5,8 \text{ г/л}$$

$$1,0 \times 10^{10} \text{ КУО/мл} - 6,23 \text{ г/л}$$

Отже, таблиця 2.3 допомогла підсумувати данні та підтвердити, що *Streptococcus thermophilus** є найкращим біологічним агентом. На це вказує просте та дешеве поживне середовище (14.75 грн/л) та виходом гіалуронової кислоти 0,598 г.л. та біомаси 6,08 г.л.

2.2. Морфолого-культуральні ознаки

Молочнокисла бактерія *Streptococcus thermophilus* широко використовується для виробництва йогурту та сиру (рис. 2.1). Цей молочний

вид, який має велике економічне значення, філогенетично близький до патогенних стрептококів, що підвищує ймовірність наявності потенціалу вірулентності. Це грампозитивна бактерія, вона не є рухомою і не утворює ендоспор. Дослідження показали негативні результати для цитохрому, оксидази та каталази, а також позитивні — для альфа-гемолітичної активності. Розмір клітин становить 0,7–0,9 мкм [16].



Рис. 2.1. Електронна мікроскопія клітин *Streptococcus thermophilus* [17]

Більшість штамів демонструють слабку альфа-гемолітичну реакцію на кров'яному агарі (або гамма-реакцію для *S. thermophilus*). Утворюють невеликі, непігментовані, гладкі або шорсткі колонії (рис. 2.2) [3].



Рис. 2.2. Колонії *S. thermophilus* на кров'яному агарі [18]

2.3. Фізіолого-біохімічні ознаки

Streptococcus thermophilus є факультативним анаеробом. За типом живлення — хемоорганогетеротроф. Оптимальна температура росту становить 37–40 °С, а значення рН — 6,8–7,0. Отже, за температурною класифікацією він є мезофілом, а за рН — нейтрофілом. За енергією кислотоутворення перевершує всі молочнокислі стрептококи, оскільки сквашує молоко мінімум через 3,5 години, максимум — через 6 годин. Гранична кислотність становить 115 °Т. Потребує амінокислот і шести вітамінів групи В.

Дуже чутливий до різних антибіотиків, особливо до пеніциліну, тому його використовують як тест-мікроорганізм для виявлення антибіотиків у молоці [19].

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

- Філум — *Firmicutes*
- Клас — *Bacilli*
- Порядок — *Lactobacillales*
- Родина — *Streptococcaceae*
- Рід — *Streptococcus*
- Вид — *S. Thermophilus*

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба в гіалуронової кислоті

Артроз — одна з найпоширеніших причин порушення працездатності серед захворювань опорно-рухового апарату. За оцінками ВООЗ, близько 15% населення світу страждає на цю патологію. В Україні артроз діагностується у кожного третього мешканця, причому частота його зростає з віком: у віковій групі 50+ захворюваність сягає 27%, а серед осіб старше 60 років — до 79% [20]. Хоча хвороба частіше вражає людей літнього віку, її прояви все частіше виявляються й у молоді (16–25 років).

Гіалуронова кислота (ГК) — ключовий структурний компонент суглобових тканин, що забезпечує їхню пружність і функціональність. У разі розвитку остеоартрозу або артриту рівень ендогенної ГК у синовіальній рідині значно знижується, що знижує амортизувальні властивості суглоба й погіршує його рухливість. Застосування внутрішньосуглобових ін'єкцій ГК дозволяє компенсувати її дефіцит, відновити в'язкість рідини та виявити хондропротекторну, знеболювальну й протизапальну дію [21, 22].

Механізм дії гіалуронової кислоти полягає у взаємодії з рецепторами CD44, що сприяє зменшенню продукції прозапальних медіаторів (інтерлейкіни 1 β , 6, 8, PGE2, металопротеїнази), стимуляції утворення протеогліканів і колагену, а також пригніченню апоптозу хондроцитів. ГК також активує проліферацію фібробластів та стимулює міграцію стовбурових клітин [21].

					НУХТ БТЕК 04.03.21 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Кірда А.О.					20	9
Перевір.		Старовойтова С.О.				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Ще у 2003 році ВООЗ внесла ін'єкційну терапію ГК до своїх рекомендацій як ефективний метод лікування остеоартрозу.

Артроцентез із подальшим введенням гіалуронату дозволяє зменшити запалення, підвищити рухливість суглоба та відновити синовіальну рідину [23, 24].

При остеопорозі кількість ГК також значно зменшується, що призводить до підвищеного тертя, пошкодження хряща й прогресуючих дегенеративних змін. У таких випадках рекомендується комбінована терапія, яка включає ГК разом із традиційними лікарськими засобами. Якщо ефективність останніх знижується — доцільно проводити ін'єкційний курс гіалуронової кислоти [25]. Це не тільки знижує потребу в знеболювальних препаратах, а й уповільнює прогрес хвороби.

Сьогодні на фармацевтичному ринку України доступні такі препарати ГК для внутрішньосуглобової терапії:

- Нуа-Joint (Тайвань) — 25 мг/2,5 мл, курс з 3 ін'єкцій, ефект до 12 місяців;
- Нуа-Joint Plus (Тайвань) — 60 мг/3 мл, достатньо однієї ін'єкції на рік [26];
- Гіалган (Італія), Остеніл (Швейцарія), Дюролан (США) — популярні препарати з різною концентрацією та тривалістю дії [26–28].

Ці препарати дозволяють лікарю адаптувати терапію до стадії захворювання та фінансових можливостей пацієнта, що забезпечує ефективне зменшення болю, покращення рухливості суглобів і відновлення якості синовіальної рідини. [25]

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Для лікування артрозу кожен препарат використовує стандартну дозу гіалуронату натрію — від 10 до 60 мг на ін'єкцію, залежно від форми випуску та показань.

На українському ринку більшість препаратів ГК представлені імпортними компаніями, що створює економічні передумови для запуску локального виробництва. Власне виробництво дозволить зменшити залежність від імпорту та зробити терапію доступнішою для населення.

Назва препарату	Готова лік.форма	Вміст ГК	Виробник	Країна походження	Джерело
Гіалуром Тендон	розчин для ін'єкцій	40 мг/2мл	S.C. ROMPHARM COMPANY S.R.L	Румунія	[25]
Гіалган	розчин для ін'єкцій	20 мг/2 мл	Fidia Farmaceutici S.p.A	Італія	[26]
Остеніл	розчин для ін'єкцій	40 мг/ 2 мл	TRB Chemedica AG	Швейцарія	[27]
Дюролан	розчин для ін'єкцій	60 мг/3 мл	Bioventus	США	[28]

В Україні артрозом страждає до 15% дорослого населення [20]. Це означає, що кількість осіб, які потребують терапії, становить приблизно 5,4 мільйона осіб, виходячи з чисельності населення України у 2024 році — 36 млн.

$$36\,000\,000 \times 0,15 = 5\,400\,000$$

Ця категорія пацієнтів потребує ефективного забезпечення препаратами на основі гіалуронової кислоти, що сприяють зниженню болю, покращенню рухливості суглобів і якості життя. Для забезпечення таких потреб необхідно стратегічно планувати виробництво та імпорт препаратів ГК [20].

Беручи до уваги переважання імпортних препаратів, доцільно розглядати покриття потреби внутрішнім виробництвом на рівні 30%, що дозволяє врахувати ринкову конкуренцію та поетапне впровадження вітчизняного продукту:

$$5\,400\,000 \times 30\% = 1\,620\,000 \text{ пацієнтів}$$

Ця частка населення потребує ефективного забезпечення препаратами на основі гіалуронової кислоти, які допомагають зменшити біль, покращити рухливість суглобів і відновити якість життя. Забезпечення такої кількості пацієнтів вимагає стратегічного підходу до планування виробництва та імпорту цих препаратів [1].

Зважаючи на те, що ринок заповнений імпортними препаратами приймемо забезпечення виробництв гіалуроновою кислотою 30% від загальної кількості хворих. Обмеження 30% дозволяє врахувати реалії конкуренції, поступово інтегруючи місцеві продукти.

$$\frac{5\,400\,000 \times 30}{100} = 1\,620\,000 \text{ людей}$$

Для подальших розрахунків ми обираємо препарат **Гіалган** як референтний продукт завдяки його поширеності на ринку та детально описаному режиму застосування в інструкції. Згідно з інструкцією до препарату “ Гіалган ” дорослим призначають по 2 мл Гіалгану (20 мг) шляхом внутрішньосуглобового введення 1 раз на тиждень упродовж 5 тижнів. З цих даних виходить, що за курс лікування людина має отримати:

$$20 \times 5 = 100 \text{ мг}$$

Розрахуємо загальну кількість продукту, спожиту 1 620 000 хворих:

$$100 \times 1\,620\,000 = 16\,200\,000 \text{ мг} = 16,2 \text{ кг}$$

Виходячи з проведених розрахунків, для забезпечення річної потреби в Україні потрібно одержати 16,2 кг гіалуронової кислоти *S. thermophilus*.

3.3. Розрахунок геометричного об'єму ферментера

За 18 годин культивування *S. thermophilus* (штам не наведено в статті) синтезує 0,598 г/л ГК [13].

Якщо в 1 л концентрація гіалуронової кислоти становить 0,598 г, то для одержання 16,2 кг ГК потрібно культуральної рідини:

$$\begin{aligned} 1 \text{ л} &- 0,598 \text{ г} \\ X \text{ л} &- 16\,200 \text{ г} \\ X &= \frac{16\,200}{0,598} = 27\,090 \text{ л} \end{aligned}$$

Враховуючи, що при виділенні біомаси та одержанні товарної форми відбудуться втрати 35% (зважаючи на складну схему виділення та очищення, а також враховуючи ін'єкційну форму препарату):

$$27\,090 \times 1,35 = 36\,571 \text{ л}$$

Далі розрахуємо, скільки культуральної рідини слід одержати за цикл ферментації для розрахунку етапів приготування посівного матеріалу. Приймаємо, що підприємство буде працювати над культивуванням біомаси упродовж 184 трудоднів, тоді об'єм культуральної рідини за добу складе:

$$V_d = V_{\text{гп}} / T_{\text{тр}} = 36\,571 / 184 = 199$$

Кількість продукту за цикл буде становити:

$$V_{\text{цк}} = (K_1 \times V_d \times T_{\text{цф}}) / 24 = (1,1 \times 121 \times 54) / 24 = 219 \text{ л /цикл,}$$

де $T_{\text{цф}}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (18 год) та час підготовки ферментера до роботи (6 год). K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1 - 1,5$) [11].

Підготовка ферментера включає: мийка та огляд – 1,5 год, перевірка на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізація апарату – 1,5 год,

охолодження ферментера – 0,5 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год.

Визначивши об'єм КР за один цикл і врахувавши коефіцієнт заповнення K_3 , визначимо геометричний об'єм ферментера:

$$V_{\Gamma} = V_{\text{крц}}/K_{\text{зап}} = 219/0,75 = 292 \text{ л,}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_3 = 292/500 = 0,6 \text{ – не перевищує заданого значення.}$$

3.4. Розрахунок кількості стадій отримання посівного матеріалу для ферментера 500

За один виробничий цикл отримують 300 л культуральної рідини (за 1.3). При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (E_{ϕ}), які становлять 10-15 %

З урахуванням покриття 10 % втрат об'єм поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом має становити:

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}} \times (1 + E_{\phi}) = 292 \times 1,1 = 321 \text{ л,}$$

де E_{ϕ} – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Отже, робочий об'єм ферментера дорівнює 321 л. За вибраного коефіцієнта заповнення 0,75 геометричний об'єм ферментера становить: $V_{\phi} = 321/0,75 = 428 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{ст1}} = 500 \text{ л}$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_{31} = 321/500 = 0,6$.

Streptococcus thermophilus є факультативними анаеробами (тип аеротолератні), тому вони пристосовані до життя за відсутності атмосферного кисню, відповідно для культивування кисень не потрібний, що обумовлює такий коефіцієнт заповнення.

Отже, уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, це значить, що геометричний об'єм ферментера обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10 % від об'єму поживного середовища.

Для засіву $V_{\text{роб.1}} = 321$ л середовища необхідно приготувати $V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} \times X_{\text{ф}} = 321 \times 0,1 = 32$ л посівного матеріалу, де $X_{\text{ф}} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Тоді об'єм поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пм1}} = 321 - 32 = 289 \text{ л,}$$

Врахуємо, що при одержанні 32 л інокуляту в посівному апараті 10% культуральної рідини буде втрачено внаслідок крапливиносy через колектор відпрацьованого повітря. З урахуванням цього об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}} \times (1 + E_{\text{ф}}) = 32 \times 1,1 = 35,2 \text{ л}$$

Об'єм інокуляту 35,2 л за коефіцієнта заповнення 0,75 можна отримати в посівному апараті об'ємом: $V_{\text{па2}} = 35,2 / 0,75 = 46,9$ л. Приймаємо посівний апарат найближчого розміру - $V_{\text{ст2}} = 50$ л.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_{32} = 35,2 / 50 = 0,70$. Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм посівного апарату обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарата становить 10 % від об'єму поживного середовища. Отже, для засіву $V_{\text{роб.2}} = 35,2$ л слід передбачити: $V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} \times X_{\text{ф}} = 35,2 \times 0,1 = 3,5$ л посівного матеріалу, де $X_{\text{ф}} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для посівного апарата.

Тоді об'єм поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пм2}} = 35,2 - 3,5 = 31,7 \text{ л}$$

Врахуємо, що при одержанні 3,5 л інокуляту в посівному апараті 10% культуральної рідини буде втрачено внаслідок крапливиносy через колектор відпрацьованого повітря. З урахуванням цього об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.3}} = V_{\text{пм2}} \times (1 + E_{\phi}) = 3,5 \times 1,1 = 4 \text{ л}$$

Об'єм інокуляту 4 л за коефіцієнта заповнення 0,75 можна отримати в посівному апараті об'ємом: $V_{\text{па2}} = 4/0,75 = 5,3 \text{ л}$. Приймаємо посівний апарат найближчого розміру - $V_{\text{ст2}} = 5 \text{ л}$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_{32} = 4/5 = 0,8$. Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм посівного апарату обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарата становить 10 % від об'єму поживного середовища. Отже, для засіву $V_{\text{роб.3}} = 4 \text{ л}$ слід передбачити: $V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} \times X_{\phi} = 4 \times 0,1 = 0,4 \text{ л}$ посівного матеріалу, де $X_{\phi} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для посівного апарата.

Тоді об'єм поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пм4}} = 4 - 0,4 = 3,6 \text{ л}$$

Одержання посівного матеріалу $V_{\text{пм3}} = 0,4$ для засіву інокулятора можна провести культивуванням *S. thermophilus* у колбах на качалці.

Для цього готують качалочні колби обсягом $V_{\text{колб}} = 750 \text{ мл}$ з коефіцієнтом заповнення $K_{3к} = 0,2$.

Тоді необхідно передбачити наявність такої кількості качалочних колб:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм4}} / (V_{\text{колб}} * K_{3к}) = 500 / (750 * 0,2) = 3 \text{ колби}$$

Отже, з метою одержання інокуляту для забезпечення виробничого культивування біомаси *S. thermophilus* необхідно передбачити ферментер на 500 з коефіцієнтом заповнення 0,75, посівні апарати об'ємом 50 та 5 л, а також передбачити наявність 3 качалочних колб.

У таблиці 3.2 наведено відомості щодо розрахунків об'ємів інокуляту та відповідного ферментаційного обладнання.

Відомості щодо розрахунків об'ємів інокуляту та
ферментаційного обладнання

відповідного

Розрахунок поживного середовища для 5 л інокулятора

Компонент	Концентрація, г/л	Кількість компоненту в 3,6 л поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Депротейнізо- вана молочна сироватка	0,45 л/л	1,62 л	А	3,6
Лактоза	10	36		
Дріжджовий екстракт	7,5	27		
Вода		≈ 1,8 л		
Конденсат		0,18		
РАЗОМ:				3,6

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у *Streptococcus thermophilus*

Ростовим субстратом для *Streptococcus thermophilus* для синтезу гіалуранової кислоти є лактоза [13]. Згідно Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), катаболізм лактози буде проходити за гліколітичним шляхом [31].

З лактози утворюється глюкоза при дії фермента β-галактозидаза (КФ 3.2.1.23) [33].

D-глюкоза за дії фосфоглюкомутази (КФ 2.7.5.1) перетворюється на глюкозо-6-фосфат, з якого ферментом глюкозо-6-фосфат ізомеразою (КФ 5.3.1.9) синтезується фруктозо-6-фосфат. Фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11) активує перетворення фруктозо-6-фосфату у фруктозо-1,6-фосфат [31, 32].

При дії ферменту фруктозодифосфатальдолази (КФ.4.1.2.13) проводиться перетворення фруктозо-1,6-дифосфату на дві сполуки: гліцеральдегід-3-фосфат та діоксиацетонфосфат. Фермент триозофосфатізомераза (КФ.5.3.1.1) каталізує взаємне перетворення гліцеральдегід-3-фосфату та діоксиацетонфосфату. До наступного катаболізму глюкози захоплюється гліцеральдегід-3-фосфат, що під дією гліцеральдегідфосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12) перетворюється на 1,3-дифосфогліцерат, а ця сполука за дії фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3) перетворюється у 3-фосфогліцерат. Дія фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.12) на 3-фосфогліцерат зумовлює перетворення його на речовину 2-фосфогліцерат. За впливу енолази (КФ4.2.1.11)

					НУХТ БТЕК 04.03.21 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Кірда А.О			БІОСИНТЕЗ 2-фосфогліцерат переходить у фруктозо-6-фосфат і піруват з фосфоенолпірува		
Перевір.		Стародойтова С.О.					
Реценз.					Літ.	Арк.	Аркушів
Н. Контроль	формування		пірувату		Фізіологія мікроорганізмів	29	статеві с
Затверд.		Стабніков В.П.			Кафедра БТМ		

піруваткінази(КФ2.7.1.40) [31,32].

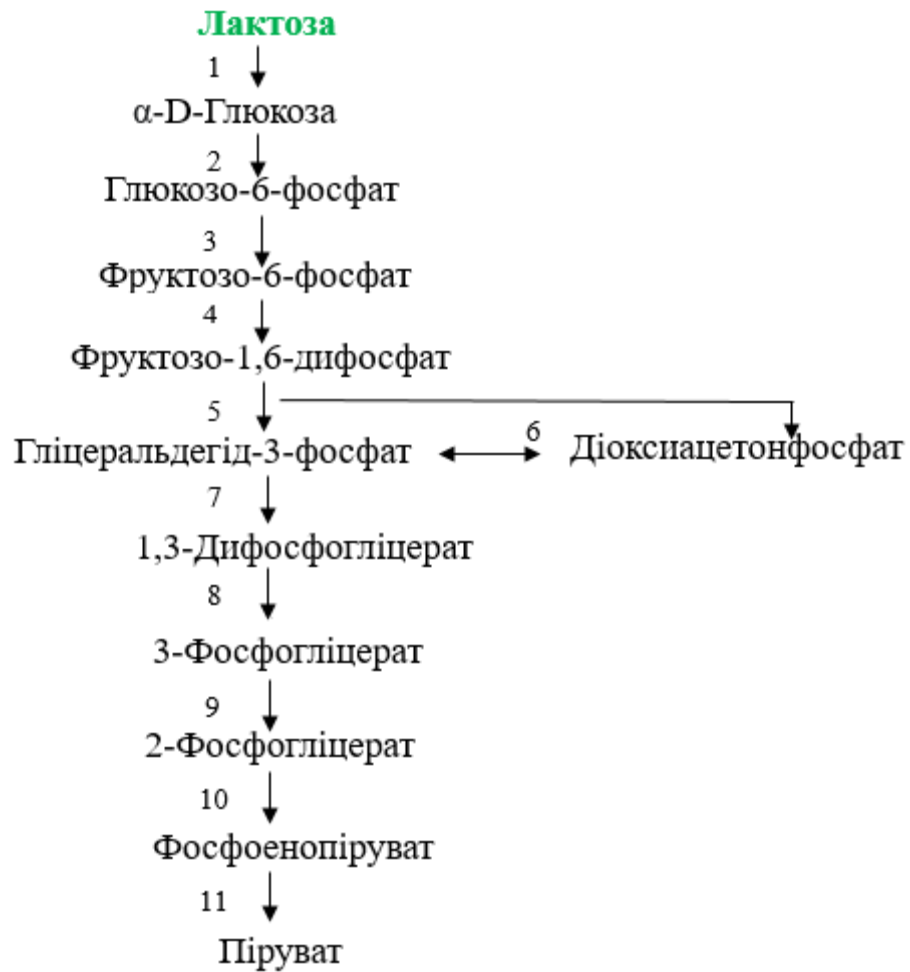


Рис. 4.1. Схема гліколізу у *Streptococcus thermophilus* [31].

Ферменти:

- 1 – β-галактозидаза (КФ 3.2.1.23);
- 2 – фосфоглюкомутаза (КФ.5.4.2.2);
- 3 – глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ.5.3.1.9.);
- 4 – фосфофруктокіназа (КФ.2.7.1.11);
- 5 – фруктозодифосфатальдолаза (КФ.4.1.2.13);
- 6 – триозофосфатізомераза (КФ.5.3.1.1);
- 7 – гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12);
- 8 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3);
- 9 – фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12);
- 10 – енолаза (КФ.4.2.1.11);
- 11 – піруваткіназа (КФ.2.7.1.40).

4.2. Біотрансформація лактози у гіалуронову кислоту

Як було зазначено вище, ростовим субстратом для *Streptococcus thermophilus* для синтезу гіалуронової кислоти є лактоза [13].

На жаль, у базі KEGG відсутня схема синтезу гіалуронової кислоти, тому ми звернулись до наукових статей. У статті [33] представлена схема синтезу гіалуронової кислоти штамом *S. thermophilus* YIT 2084, починаючи з катаболізму лактози.

Тоді розпишемо яким чином лактоза перетворюється на глюкозу та подальше утворення гіалуронової кислоти внаслідок ряду реакцій.

Лактоза гідролізується на глюкозу та галактозу під дією β -галактозидази (КФ 3.2.1.108, 3.2.1.62). Далі галактоза перетворюється на галактозо-1-фосфат за впливу галактокінази (КФ: 2.7.1.6). З цієї сполуки утворюється УДФ-галактоза при дії галактозо-1-фосфат-уридилтрансферази (КФ 2.7. 7.12). Тим часом, глюкоза за допомогою глюкокінази (КФ 2.7.1.2) перетворюється на глюкозо-6-фосфат, що залучається частково до пентозофосфатного циклу, а частково перетворюється на глюкозо-1-фосфат за допомогою фосфоглюкомутази (КФ.5.4.2.2). Потім з УДФ галактози під впливом ферменту УФД-глюкозо-4-епімераза (КФ 5.1.3.2) та з глюкозо-1-фосфату під впливом ферменту УДФ-глюкозо-пірофосфорилази (КФ 2.7.7.9) синтезується УДФ-глюкоза, що далі за дії УДФ-глюкозо-дегідрогеназа (КФ 1.1.1.22) стає УДФ-глюкуроновою кислотою [33].

Синтезована раніше сполука глюкозо-6-фосфат за впливу фосфоглюкоізомерази (КФ 5.3.1.9) перетворюється на фруктозо-6-фосфат, з якого за допомогою амідотрансферази (КФ 2.4.2.14) утворюється глюкозамін-6-фосфат. Ця речовина ферментом ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.9) перетворюється на N-ацетил-глюкозамін-6-фосфат, що переходить у N-ацетил-глюкозамін-1-фосфат під впливом ферменту мутази (КФ 5.4.99). З цієї речовини за допомогою пірофосфорилази (КФ 2.7.7) синтезується УДФ-N-ацетил-глюкозамін.

Утворена раніше сполука УДФ-глюкуронова кислота та УДФ-N-ацетил-глюкозамін залучаються до синтезу гіалуронової кислоти, що протікає за дії ферменту гіалуронатсинтази (КФ 2.4.1.212) [33].

Фруктозо-6-фосфат залучається до гліколізу, ензимом фосфофруктокіназою (КФ.2.7.1.11) перетворюючись на фруктозо-1,6-дифосфат.

Потім за впливу фруктозодифосфатальдолази (КФ.4.1.2.13) здійснюється перетворення фруктозо-1,6-дифосфату на дві сполуки: гліцеральдегід-3-фосфат та діоксиацетонфосфат. Ензим триозофосфатізомераза (КФ.5.3.1.1) каталізує взаємне перетворення гліцеральдегід-3-фосфату та діоксиацетонфосфату. До подальшого гліколізу залучається саме гліцеральдегід-3-фосфат, що за впливу гліцеральдегідфосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12) перетворюється на 1,3-дифосфогліцерат, який далі під дією фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3) трансформується у 3-фосфогліцерат. Вплив фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.12) на 3-фосфогліцерат індукує перетворення цієї сполуки на 2-фосфогліцерат. За впливу енолази (КФ 4.2.1.11) 2-фосфогліцерат переходить у фосфоенолпіруват [31, 32].

Далі проходить утворення пірувату з фосфоенолпірувату під дією піруваткінази (КФ 2.7.1.40), що за допомогою фермента піруватдегідрогенази (КФ 1.2.4.1) залучається до циклу трикарбонових кислот (ЦТК). У циклі трикарбонових кислот відбувається перетворення пірувату на оксалоацетат через ацетил-Ко-А. ЦТК служить джерелом проміжних продуктів, необхідних для конструктивного метаболізму, а саме оксалоацетату, сукцинату і 2-оксоглутарату [31, 32].

Ферменти

1 – β -галактозидаза (КФ 3.2.1.23);

2 – галактокіназа (КФ: 2.7.1.6);

- 3 – галактозо-1-фосфат-уридилтрансфераза (КФ 2.7. 7.12);
- 4 – УФД-глюкозо-4-епімераза (КФ 5.1.3.2);
- 5 – глюкокіназа (КФ 2.7.1.2);
- 6 – глюкозо-6-фосфат-ізомераза (КФ 5.3.1.9);
- 7 - фосфоглюкомутаза (КФ.5.4.2.2);
- 8 – УДФ-глюкозо-пірофосфорилаза (КФ 2.7.7.9);
- 9 - УДФ-глюкозо-дегідрогеназа (КФ 1.1.1.22);
- 10, 11 – гіалуронатсинтаза (КФ 2.4.1.212);
- 12 – фосфоглюкоізомераза (КФ 5.3.1.9);
- 13 – амідотрансфераза (КФ 2.4.2.14);
- 14 – ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.9);
- 15 – мутаза (КФ 5.4.99);
- 16 – пірофосфорилаза (КФ 2.7.7);
- 17 - фосфофруктокіназа (КФ.2.7.1.11);
- 18 – фруктозодифосфатальдолаза (КФ.4.1.2.13);
- 19 – триозофосфатізомераза (КФ.5.3.1.1);
- 20 – гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12);
- 21 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3);
- 22 – фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12);
- 23 – енолаза (КФ.4.2.1.11);
- 24 – піруваткіназа (КФ.2.7.1.40).
- 25 - піруватдегідрогеназа (КФ 1.2.4.1).

РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Вибір способу культивування

Для біосинтезу гіалуронової кислоти за участю бактерій роду *Streptococcus* доцільно застосовувати **глибинний (субмерсний)** метод культивування. Цей метод забезпечує інтенсивне розмноження мікроорганізмів у рідкому поживному середовищі з активною аерацією та перемішуванням, що є критичним для оптимального метаболізму та синтезу цільового продукту.

Streptococcus thermophilus належить до **аеротолерантних факультативних анаеробів**, що означає здатність рости як за наявності, так і за відсутності кисню. У присутності кисню бактерія продукує більше АТФ за рахунок аеробного дихання, що підвищує її енергетичну ефективність. Крім того, цей мікроорганізм є **мезофілом**, із оптимальним температурним діапазоном росту 30–40 °С. Найбільш сприятливе значення рН для його культивування становить 6,8–7,0 [34].

У процесі метаболізму *S. thermophilus* синтезує молочну кислоту, що спричиняє поступове зниження рН середовища. У зв'язку з цим необхідно, щоб ферментер був оснащений **автоматизованою системою регулювання кислотності та температури**, що забезпечить стабільні умови для росту культури.

					НУХТ БТЕК 04.03.21 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Прізвище І.Б.					35	21
Перевір.		Прізвище І.Б.				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Бактерії роду *Streptococcus* є **вимогливими до складу поживного середовища**, оскільки потребують наявності аміноцукрів, нуклеотидів, полісахаридів та інших мікронутрієнтів для синтезу клітинної стінки. Таким чином, середовище повинно бути збагачене необхідними біосинтетичними прекурсорами [35].

5.2. Обґрунтування вибору ферментера

Ферментер — це спеціалізований біореактор, призначений для культивування мікроорганізмів в умовах суворого контролю технологічних параметрів. Його конструкція забезпечує підтримання постійних значень температури, рН, рівня аерації та перемішування, а також дозволяє точно дозувати поживні речовини та відводити продукти метаболізму.

Ферментери широко застосовуються у таких галузях:

- мікробіологічна промисловість;
- фармацевтика та медицина;
- харчова промисловість;
- біоенергетика;
- хімічна промисловість.

Для культивування *S. thermophilus* важливо забезпечити **стерильні умови**, оскільки за нейтрального рН і мезофільної температури можуть активно розвиватися сторонні мікроорганізми. Стерилізація поживного середовища виконується в автоклаві, а його подача до ферментера здійснюється через герметичні патрубки в асептичних умовах, що унеможлиблює контамінацію.

Ферментер повинен бути оснащений:

- **магнітною муфтою з роздільною мембраною**, яка забезпечує передачу обертового моменту до мішалки без прямого контакту з внутрішнім середовищем;
- **сорочкою для нагріву та охолодження**, через яку циркулює теплоносій, стабілізуючи температуру;

- **контрольно-вимірювальними приладами**, які дозволяють в реальному часі слідкувати за рН, температурою, тиском і рівнем розчиненого кисню;
- **системою для внесення інокулянту** та дозування поживних речовин;
- **пробовідбірником** для оперативного контролю параметрів процесу культивування [36].

5.3. Обґрунтування підготовки повітря

Streptococcus thermophilus є факультативними анаеробами (тип аеротолератні), тому вони пристосовані до життя за відсутності атмосферного кисню, але за його наявності виробляють АТФ за допомогою аеробного дихання [13].

У факультативних анаеробів бродіння становить обов'язкову першу стадію катаболізму глюкози (дисиміляція або енергетичний обмін), що включає реакції розщеплення складних органічних речовин до простіших, яке супроводжується їх окисненням і виділенням корисної енергії), за якою може відбуватися аеробне окиснення продуктів, що утворилися, якщо в середовищі присутній кисень [13].

Анаеробні умови на мікробіологічних виробництвах, які засновані на використанні анаеробних продуцентів, створюють шляхом герметизації апаратури, продуванням середовища інертними газами, у тому числі газоподібними продуктами, що утворилися під час ферментації. Відсутність необхідності аерації середовища трохи спрощує конструкцію ферментера (біореактора) і полегшує керування процесом анаеробної ферментації [40,83].

Отже, з огляду на вищеописані властивості нашого продуцента, слід виключити варіант продування азотом поживного середовища, оскільки цей підхід використовують для облигатних анаеробів, а наш **продуцент відноситься до факультативних (тип аеротолератні)**. Зважаючи на це, приймаємо рішення щодо проведення процесу вирощування біомаси *S.*

thermophilus в безкисневих умовах без продування азотом при забезпеченні асептичних умов.

Разом з тим, для перенесення посівного матеріалу з одного інокулятора до іншого та від інокулятора до виробничого ферментера передбачається використання труби перетискування, що потребує підготовки стерильного повітря. Шляхом подачі стерильного повітря через трубу перетискування посівний матеріал переходить до наступного апарата.

Підготовку стерильного стисненого аераційного повітря проводять у кілька стадій. Перш за все, атмосферне повітря забирають турбокомпресором через забірну шахту на висоті приблизно 10-12 м, це пов'язано з тим, що чим більша висота забору повітря, тим менша кількість сторонніх частинок у ньому міститься. Потім повітря звільняють від грубих домішок для одночасного захисту компресорів, для цього повітря пропускають через фільтр попереднього очищення. Далі повітря проходить стиснення у турбокомпресорі до 0,35–0,5 МПа для подолання опору фільтрувальних матеріалів на подальших етапах фільтрації; стиснення зумовлює підвищення температури повітря до 120–250°C і збільшення вмісту вологи на одиницю об'єму.

Тому далі повітря слід охолодити і звільнити від зайвої вологи – для цього його запускають до водяного теплообмінного апарату. Потім повітря надходить у ресивер, де видаляється волога і вирівнюється його тиск. Ступеня очищення 98% досягають під час пропускання повітря через головні фільтри, які, як правило, складаються з набивних волокон. Після цього повітря зазнає очищення на індивідуальних фільтрах, які встановлюють безпосередньо перед кожною одиницею ферментаційного обладнання, ступінь очищення повітря досягає 99,999% [40, 83].

Після належної підготовки в кінці культивування подають повітря і посівний матеріал через трубу перетискування переходить до наступного апарата.

5.3 Обґрунтування вибору миючих засобів та дезінфектантів

Виробництво гіалуронової кислоти (ГК) є складним біотехнологічним процесом, що потребує суворого дотримання санітарно-гігієнічних норм та жорсткого контролю якості. Оскільки ГК активно застосовується у фармацевтичній, косметичній та медичній галузях, її отримання має відповідати стандартам належної виробничої практики (GMP) та міжнародним нормам стерильності. Забезпечення чистоти виробничого середовища та уникнення мікробного забруднення є основними аспектами технологічного процесу. Для цього необхідно створити асептичні умови на всіх етапах виробництва, що сприятиме отриманню якісного та безпечного кінцевого продукту [37, 38].

Відповідно до ДСТУ ISO 14644-1:2009 Чисті приміщення та пов'язані з ними контрольовані середовища. Частина 1. Класифікація чистоти повітря (ISO 14644-1:1999, IDT)) , чисті приміщення для виробництва ГК поділяються за класами чистоти. У класі D допускається наявність не більше ніж 3 500 000 мікроорганізмів у 1 м³ повітря розміром 0,5 мкм та 20 000 частинок розміром 5 мкм. У класі С цей показник знижується до 3500 мікроорганізмів у 1 м³ повітря розміром 0,5 мкм та 2000 розміром 5 мкм. Найвищі вимоги встановлюються для класу В/А, де кількість частинок розміром 0,5 мкм не повинна перевищувати 3500 мікроорганізмів [37, 38].

Складовими частинами законодавства в галузі санітарії є закони, постанови, положення, санітарні правила і норми затверджені Міністерством охорони здоров'я України, Міністерством охорони навколишнього природного середовища та ядерної безпеки України, Міністерством праці та соціальної політики, Держстандартом України (наприклад, закони «Про охорону атмосферного повітря», «Про охорону праці», санітарні правила ДСП 1731- 96 «Охорона атмосферного повітря населених місць», ДСН 3.3.6.042-99 «Санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень», Державний стандарт України ДСТУ ISO 14011-97 «Постанови щодо здійснення екологічного аудиту» і та ін.) [39].

Однією з ключових складових забезпечення належної якості продукції у біотехнологічному виробництві є всебічна санітарна підготовка. Вона охоплює комплекс заходів, спрямованих на попередження мікробної контамінації, що може виникнути на різних етапах технологічного процесу. Основні напрямки цієї підготовки включають [40]:

- **Підготовка персоналу**, який є потенційним джерелом мікробного забруднення. Цей етап охоплює дотримання особистої гігієни, носіння спеціального захисного одягу, навчання персоналу правилам поведінки в зоні контролю чистоти та обов'язкову перевірку рівня засвоєння знань;
- **Обробка виробничих приміщень**, що здійснюється із застосуванням мийних, дезінфекційних і комбінованих засобів для зниження рівня загальної забрудненості поверхонь і запобігання поширенню патогенної мікрофлори;
- **Санітарна обробка обладнання**, яка включає послідовне миття, дезінфекцію зовнішніх поверхонь, ополіскування внутрішніх частин та подальшу стерилізацію;
- **Підготовка інженерних комунікацій**, що підлягають миттю та стерилізації;
- **Контроль герметичності і перевірка ефективності стерилізації** – завершальний етап підготовки обладнання до виробництва.

Для очищення технологічного обладнання використовують кальциновану та каустичну соду у вигляді гарячих (70 °С) 2–4% водних розчинів. Їх застосовують як окремо, так і в поєднанні з іншими синтетичними мийними засобами для підвищення ефективності очищення [40].

Сучасні мийні засоби повинні відповідати наступним вимогам:

- мати низький поверхневий натяг;
- демонструвати високу змочувальну, емульгуючу, пінну здатність;
- викликати солюбілізацію, пептизацію та набухання білків;
- бути легко змиваними водою після застосування.

У біотехнологічному виробництві, де щоденно обробляють великі площі приміщень та об'єми обладнання, надається перевага доступним і високоефективним дезінфекційним засобам. Однак, при їх виборі важливо враховувати не лише біоцидні властивості, а й потенційну токсичність для людини [40].

Також слід враховувати вартість засобу та його витрату на 1 м² поверхні (орієнтовно 100 мл робочого розчину), відповідно до методичних рекомендацій МОЗ України [40].

Графіки прибирання:

- генеральне прибирання — перед запуском виробництва;
- щоденне — перед кожною зміною (1–3 рази на добу);
- стіни, вікна, двері — щонайменше один раз на місяць;
- підлоги — щодня.

Для розрахунку кількості мийного розчину враховують площу підлоги та стін (до висоти 2,5 м) [40].

Технічне обслуговування та очищення обладнання

На підприємстві має бути встановлений чіткий графік технічного обслуговування обладнання з призначенням відповідальних осіб [41]. Окрім того, повинні бути розроблені письмові методики очищення з детальним описом всіх етапів та процедур, що дозволяють проводити ефективне відтворюване очищення будь-якого обладнання.

До обов'язкових елементів методик очищення відносяться [41]:

- призначення відповідальної особи;
- графіки санітарної обробки;

- перелік матеріалів і мийних засобів з відповідними концентраціями;
- інструкції зі збирання та розбирання обладнання;
- порядок зняття маркування попередньої серії;
- заходи захисту очищеного обладнання від забруднення;
- перевірка чистоти перед використанням;
- регламентація максимального інтервалу між закінченням роботи та початком очищення.

У випадку використання обладнання в режимі безперервного або серійного виробництва обробку слід проводити з визначеною періодичністю, щоб уникнути накопичення залишкових речовин або мікроорганізмів [41].

При переході до виробництва іншого продукту очищення є обов'язковим, особливо для неспеціалізованого обладнання, щоб уникнути перехресної контамінації.

Варто також встановити та обґрунтувати допустимі рівні залишків мийних засобів і критерії придатності до повторного використання обладнання. Усі одиниці обладнання мають бути промарковані відповідно до їх статусу – «чисте», «в роботі», «забруднене» тощо [41].

Сучасні підприємства використовують автоматизовані системи CIP (Cleaning-In-Place), які дозволяють здійснювати внутрішнє миття обладнання без демонтажу. Цей процес передбачає розпилення мийного розчину, збір його в окрему ємність, промивку водою та подальшу стерилізацію паром [40].

Дезінфекція приміщень та обладнання повинна супроводжуватися **ротацією дезінфікуючих засобів** для попередження розвитку стійкої мікрофлори. Оптимально змінювати дезінфікуючі розчини щонайменше раз на два тижні або використовувати комбінації декількох засобів з різним механізмом дії [41].

Таблиця 5.1

Порівняльна характеристика дезінфікуючих та миючих засобів

Засіб, склад	Виробник	Призначення	Властивості	Активність	Концентрація	Термін та умови зберігання	Джерело
Дезінфекційний засіб ПРАЙМДЕЗИМ. Діючі речовини, %: дидецилдиметиламоній хлорид – 26,60–29,40; N-(3-амінопропіл)-N-додецилпропан-1,3-діамін – 2,85–3,15; допоміжні речовини, %: фермент протеаза, детергенти та інші функціональні речовини згідно формули, засобу вода – до 100,0 %.	ТОВ «ПРАЙМДЕЗ» (Україна) за ТУ У 20.2-24923956-004:2021 із сировини «CHRISTEYNS FRANCE SA» (Франція)	Призначений для дезінфекції, достерилізаційного очищення, суміщених процесів дезінфекції та достерилізаційного очищення.	Робочі розчини видаляють забруднення будь-якого походження із зовнішніх поверхонь, внутрішніх каналів та порожнин виробів медичного призначення (ВМП), гомогенізують біологічні виділення. Робочі розчини засобу не містять окислювачів, не викликають корозії, що дозволяє використовувати їх для обробки виробів, з нержавіючої сталі, алюмінію, латуні, міді, титану, полівінілхлориду,	Бактерицидні, спороцидні, фунгіцидні, туберкулоцидні, віруліцидні властивості.	1,0% (100 мл концентрату змішати з 9900 мл води)	Термін придатності– 3 роки з дати виготовлення. Зберігати в оригінальній упаковці за температури від +5 до +40°C у недоступному для дітей місці. Забороняється використання засобу після закінчення терміну	[42]

Продовження таблиці 5.1

			поліетилену високої щільності, поліпропілену, оргскла, полікарбонату, акрилонітрилбутадієнстиролу, тетрафторетилену, поліуретану тощо. Засіб добре змивається, не утворює нальоту, не фіксує органічні забруднення.			придатності.	
Дезінфекційний засіб Санітаб. Натрієва сіль дихлорізоціанурової кислоти - 80,0-85,0% (активно діюча речовина, джерело активного хлору); допоміжні речовини: адипінова кислота (8-10%), суміш карбонату натрію та бікарбонату	ТОВ "Інтердез", Україна	Призначено для проведення профілактичної, поточної, заключної дезінфекції, генеральних прибирань.	За параметрами гострої токсичності належить до 3 класу помірно небезпечних речовин при введенні в шлунок та до 4 класу мало небезпечних речовин при нанесенні на шкіру та при парентеральному введенні, у формі таблеток в насичуючих концентраціях пари відноситься до 4 класу малонебезпечних засобів	Бактерицидні, спороцидні, фунгіцидні, туберкулоцидні, віруліцидні властивості.	0,06% (4 таблетки засобу розчинити у 10 л води)	Зберігають в щільно закритому пакуванні виробника, у прохолодних, темних, сухих приміщеннях, які не мають доступу для сторонніх осіб, окремо від	[43]

Продовження таблиці 5.1

натрію або лише карбонат натрію (8-10%)						продуктів харчування, лікарських засобів, сильних кислот, лугів, окисників. Засіб та його робочі розчини не займисті, вибухобезпечні. Гарантійний термін зберігання засобу - 5 років	
---	--	--	--	--	--	---	--

Закінчення таблиці 5.1

<p>Засіб для передстерилізаційного очищення «ENDOQUICK», діючими речовинами якого є калію гідроксид у межах 2,0 - 2,5 % та оксидетильований жирний спирт 7,0 %</p>	<p>ТОВ "Сарая Україна" (Україна)</p>	<p>Застосовується для очищення, у т.ч. достерилізаційного очищення.</p>	<p>Робочий розчин має миючі властивості. Злегка каламутна рідина без видимих механічних домішок від безбарвної до світло-жовтого кольору зі слабким запахом. Значення рН засобу – понад 13.</p>	<p>Бактеріостатичні, фунгіостатичні властивості..</p>	<p>0,5% (50 мл засобу на 10 л водопровідної води)</p>	<p>Термін придатності 2 роки. Зберігати у закритій упаковці виробника у темному, сухому місці, недоступному дітям, захищеному від потрапляння прямих сонячних променів при температурі від -5°C до +40°C.</p>	<p>[44]</p>
--	--------------------------------------	---	---	---	---	---	-------------

Засоби для обробки рук персоналу

Для санітарної обробки рук персоналу можна використати такі антисептичні засоби, як «Стерилліум», рецептурний розчин «С-4» (суміш перекису водню та мурашиної кислоти), 76% розчин етилового спирту та «Неостерил М». Враховуючи необхідність регулярної обробки рук, варто обирати найбільш безпечні засоби, які не викликають подразнення шкіри.

Серед запропонованих варіантів **оптимальним вибором** є «Стерилліум», що має такі властивості:

- знищує 99,999% транзиторної мікрофлори шкіри за 30 секунд;
- забезпечує пролонгований ефект до 1 години;
- не порушує природний водно-жировий баланс шкіри;
- має фунгіцидну, туберкулоцидну та пролонговану бактерицидну дію [45].

Склад «Стерилліуму»:

- 2-пропанол (43,0-47,0%);
- 1-пропанол (28,5-31,5%);
- мецетронію етилсульфат (0,18-0,22%);
- зволожуючі та пом'якшуючі компоненти.

Засіб зареєстрований в Україні 01.01.2018 року.

Оскільки для запобігання розвитку резистентності мікроорганізмів необхідно чергувати антисептичні засоби, додатково використовується «Неостерил М», що містить полігексанід, амфотерні та неіоногенні поверхнево-активні речовини. Засіб має широкий спектр дії: бактерицидний (зокрема проти *E. coli*, *S. aureus* і *P. aeruginosa*), фунгіцидний (проти *C. albicans*) та віруліцидний (проти вірусів грипу, герпесу, ротавірусів тощо) [46].

Засіб зареєстрований в Україні 01.02.2019 року.

5.4. Розрахунки витрат мийних та дезінфікуючих засобів

З метою одержання інокуляту для забезпечення виробничого культивування *Streptococcus thermophilus* необхідно передбачити ферментер на 500 з коефіцієнтом заповнення 0,75, посівні апарати об'ємом 50 та 5 л, а також передбачити наявність 3 качалочних колб.

Технологічна схема біосинтезу гіалуронової кислоти *S. thermophilus* (штам не наведено в статті) включає такі підготовчі етапи:

- підготовка повітря для перетискування інокуляту;
- приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках;
- приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторах;
- приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого культивування у ферментері;
- підготовка 25%-го розчину аміаку.

Також потрібно таке допоміжне обладнання:

- збірники 5 л, 50 л, 400 л для приготування поживного середовища;
- збірник 15 л для 25%-го розчину аміаку.

Біосинтез гіалуронової кислоти *S. thermophilus* реалізується у спеціальних приміщеннях, до яких входить цех виробничого біосинтезу, лабораторія для здійснення додаткових робіт, в якій розташовується лабораторний бокс, автоклави, термостати, холодильники та обладнання необхідне для контролю концентрації цільового продукту, біомаси та інших технологічних чинників.

Тому для розробки плану приміщення необхідно врахувати діаметри апаратів, що розташовані на підлозі, відстань між обладнанням - 1 м та від стін - 1,5 м. Рис. 2.1. зображує план

приміщення для забезпечення виробничого культивування *S. thermophilus*.

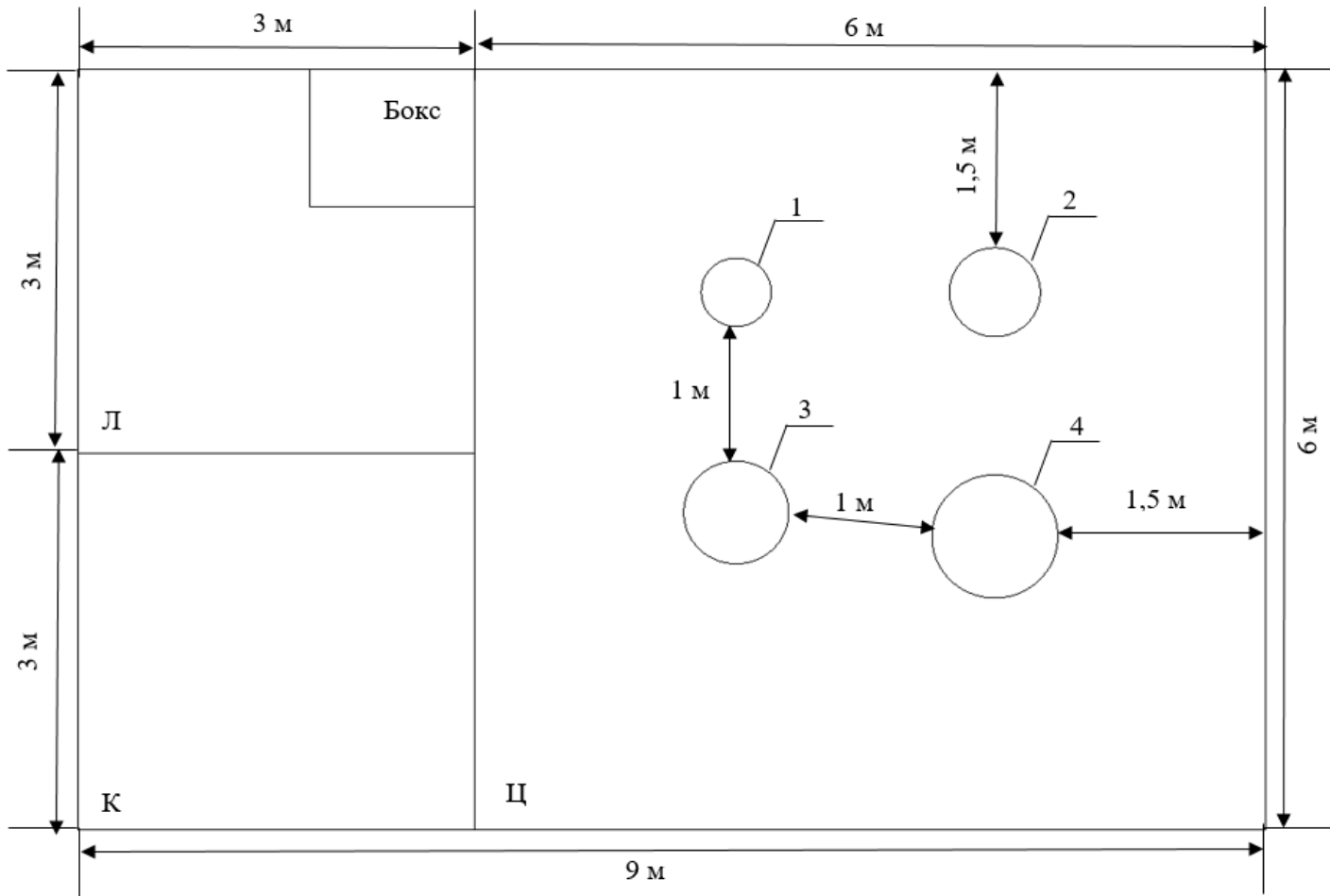


Рис. 5.1. План приміщення для забезпечення виробничого культивування *S. thermophilus*:

Ц - цех виробничого біосинтезу та вирощування інокуляту: 1 – збірник на 50 л (З-16); 2 – інокулятор на 50 л (ІН-19); 3 – збірник на 400 л (З-21); 4 - ферментер на 500 л (ФР-24); Л – мікробіологічна лабораторія; К – приміщення з качалками.

Таблиця 5.2

Розміри обладнання для біосинтезу гіалуронової кислоти *S. thermophilus*

Обладнання	Геометричний об'єм, л	Діаметр, м	Висота, м
Збірник для приготування композиції А (З-11)	5	0,3	0,41
Збірник для приготування композиції А (З-16)	50	0,5	0,8
Збірник для приготування композиції А (З-21)	400	0,75	1,09
Збірник для аміачної води (З-9)	15	0,28	0,35
Інокулятор (ІН-14)	5	0,3	0,9
Інокулятор (ІН-19)	50	0,65	1,5
Ферментер (ФР-24)	500	0,9	1,9
Всього	1 025		

Отже, за даними таблиці 2.2, загальний об'єм необхідного обладнання складає 1 025 л.

Було прийнято, що підприємство буде працювати над культивуванням упродовж 184 трудоднів. Тому для забезпечення чистоти процесу миття підлоги слід проводити кожного дня. Один раз на місяць організовують генеральне прибирання, що включає миття стін, підлоги, вікон та інших поверхонь, тобто це відбувається 6 разів на 184 дні.

Тому далі розрахуємо приблизну площу оброблення миючими та дезінфікуючими розчинами, враховуючи площу підлоги виробничого приміщення та площу стін на висоту, щоб дізнатись об'єми дезінфікуючих засобів. Оскільки у нас апарати малого об'єму підвішені на певну висоту для економії простору (максимальна 2,7 м), приймемо висоту стін 5 м, залишаючи запас простору для обслуговування цього обладнання. Але миття стін буде проходити на висоту 2,5 метра, оскільки це практично можливо.

Як можна розрахувати зі схеми, площа підлоги виробничого цеху біосинтезу складає 36 м² (6×6 м), площа стін становить – [(6× 2,5) + (6 × 2,5)] × 2 = (15+15) × 2 = 60 м². Тоді загальна площа складає 36 + 60 = 96 м².

Загальну площу поверхні обробки відповідними засобами наведено в *табл. 5.3*.

Таблиця 5.3

Загальні дані розрахунків щодо площі стін та підлоги приміщень

Приміщення	Площа підлоги, м²	Площа стін, м²	Загальна площа, м²
Цех виробничого біосинтезу та вирощування інокуляту	36	60	96
Мікробіологічна лабораторія	9	30	39
Приміщення з качалками	9	30	39
Загальна площа	54	120	174

Загальна потреба в культуральній рідині становить 36 571 л, при цьому за один цикл отримують 219 л культуральної рідини. Тоді кількість виробничих циклів буде $36\,571/219 = 166$.

Оскільки миття обладнання проводять перед кожним циклом, кількість процесів миття за весь період виробництва становитиме 167, враховуючи заключну процедуру миття після останнього циклу. Тоді загальний обсяг, що потребує обробки, складає:

$$1,025 \times 167 = 171,17 \text{ м}^3$$

Розраховані площі та об'єми, що підлягатимуть обробці протягом всього періоду виробництва підсумовано в *табл. 2.4*.

Таблиця 5.4

**Розрахунок загальної площі миття оброблюваного об'єкту за
весь період отримання гіалуронової кислоти *S. thermophilus***

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблювано го об'єкту, м² (м³)	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м² (м³)
Обладнання	1,025	167	171,17
Підлога	54	184	9 936
Стіни, двері, вікна	120	6	720

На сучасних біотехнологічних та фармацевтичних підприємствах миття обладнання здійснюють за допомогою СІР-мийки, що встановлюється в обладнання та за допомогою розпилення миючого засобу проводить процес миття. Витрати робочого розчину з використанням СІР-мийки становлять 20% від об'єму обладнання. Тоді для забезпечення миття 171,17 м³ обладнання потрібно миючого засобу:

$$171,17 \times 0,2 = 34,2 \text{ м}^3 \text{ засобу/рік}$$

Узагальнені відомості по підбору мийних та дезінфікуючих засобів представлено у таблиці 2.5. При виборі засобів для обробки обладнання, а також забезпечення чистоти виробничих поверхонь і приміщень враховують вартість засобів, їх активність, концентрацію і відповідно витрату. Як було вказано вище, для обробки 1 м² поверхні/приміщень потрібно 100 мл розчину дезінфікуючого засобу, тому врахуємо це у розрахунках.

Таблиця 5.5

Узагальнені відомості по підбору мийних та дезінфікуючих засобів

Назва мийного/дезінфікувального засобу (діюча речовина)	Державна реєстрація	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ²	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікуювального засобу, грн	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
«ПРАЙМДЕЗИМ» (дидецилдиметиламоній хлорид, N-(3-амінопропіл)-N-додецилпропан-1,3-діамін) ¹	Наказ від 26.04.2021 №819 (до 26.04.2026)	Поверхні приміщень (підлога, стіни)	1,0	10 656	1 065,6	1020	10,2	10 869,12
«Санітаб» (натрієва сіль дихлорізоціанурової кислоти) ²	Зареєстрований в Україні 05.06.2019	Поверхні приміщень (підлога, стіни)	0,06 (за активним хлором)	10 656	1 065,6	325	5 0,19	207,79
«ENDOQUICK» *, (калію гідроксид 2,0 - 2,5 % та оксиетильований жирний спирт 7,0%) ³	Зареєстрований 15.06.2020 (до 15.06.2026)	Обладнання	0,5	171 170	34 200	6027,39	30,1	1 029 420

1 https://gdent.com.ua/dezinfekciya/koncentraty-dlya-obrabotki-instrumenta/prajmdezim-11-analog-surfanios?gad_source=1&gbraid=0AAAAA_FhkcxD7V_xFwkLXNjuIwS6KFs1&gclid=EAIaIQobChMIhdm0rerKjAMVtA-iAx30BxX0EAQYAiABEgLIVvD_BwE

2

https://rozetka.com.ua/ua/387816813/p387816813/?gad_source=1&gbraid=0AAAAADIXhI4wqPWIHsQPtbGrXTAzG4o0O&gclid=EAIaIQobChMIypbmuOrKjAMV3xmiAx20ixdIEAQYAiABEgJZzvD_BwE

3 - <https://www.vendorportal.ecms.va.gov/NAC/MedSurg/Details?lognumber=8439665&type=fss>

Примітка*: ціна на засіб «ENDOQUICK» відсутня у вільному доступі, оскільки це спеціалізований миючий засіб для професійного використання у фармацевтичних і медичних установах і закупається через спеціалізовані канали постачання. Ціна за 1 л становить 145,20 дол. США. Станом на 12.05.2025 за курсом 41,51 грн за 1 долар вартість засобу складає 6027,39 грн.

Таким чином, серед розглянутих засобів «Санітаб» виявився найдешевшим засобом для обробки поверхонь і приміщень. Причому засіб «Санітаб» має рекордно низьку ціну, у порівнянні зі всіма наведеними засобами. Разом з тим, важливим принципом є регулярна ротація дезінфікуючих засобів для уникнення розвитку резистентної мікрофлори. Оптимальний підхід включає зміну дезінфекційних розчинів кожні 2 тижні або комбінування кількох типів засобів. Тому будемо використовувати всі наведені засоби, незважаючи на економічні показники, оскільки вони всі володіють високою активністю, що сприятливо впливатиме на підтримання необхідного рівня чистоти на підприємстві.

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання для біосинтезу біомаси

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
ПЗ - 1	Повітрязабірник	1	Повітрязабірник стіновий NavyFlex VLB100 «NavyFlex», Польща, діаметр, мм – 100, матеріал з якого виготовлено продукцію - полірована нержавіюча сталь. [47]
Ф - 2	Фільтр грубого очищення	1	Комірковий фільтр «Укрвентсистеми» (Україна). Продуктивність - 1540 м ³ /год; ефективність очищення E=80%. Матеріал – пінополіуретан. Габаритні розміри, у мм: 514×514×32. [48]
К-3	Компресор	1	Турбокомпресор ID TURBO COMPRESSOR TRA-TM «DALGAKIRAN» (Туреччина) . Продуктивність складає 2470-6000 м ³ /год. Робочий тиск складає 2-11 бар. Габаритні розміри, мм: 3700×2000×2000. [49]
Т-4	Теплообмінник охолоджувач повітря	1	Теплообмінник охолоджувач повітря рефрижераторного типу «Hankinson SPX» (Німеччина). Продуктивність складає 1700 м ³ /год. Потужність складає 5,5 кВт, максимальна температура - 45 °С. [50]
Р-5	Ресивер - вологовідділювач	1	Ресивер - вологовідділювач «ELMAG» (Україна) 1000 л. Максимальний робочий тиск складає 11,5 бар. Габарити, мм: 2350×790. Матеріал з якого виготовлено - нержавіюча сталь AISI 304. [51]

					НУХТ БТЕК 04.01.01 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Кірда А.О						
Перевір.		Старовойтова С.О					56	4
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Т-6	Теплообмінник-нагрівач повітря	1	Теплообмінник-нагрівач повітря ПНВ 113-202-01УЗ ТОВ «ВКЦ ТІЛС» (Україна). Потужність 2500 м ³ /год. Габарити, мм: 775×450×130. Максимальна температура теплоносія: 200 °С. [52]
Ф-7	Фільтр головної очистки повітря	1	Кишеньковий фільтр для тонкого очищення повітря F9, ТОВ «АІС-КЛІМАТ» (Україна). Фільтрувальний матеріал - поліестер та спанбонд. Матеріал корпусу – оцинкована сталь. Габарити, мм: 490×490. [53]
ІФ-13, ІФ-18, ІФ-23	Індивідуальний фільтр	3	Кишеньковий фільтр для тонкого очищення повітря F9, ТОВ «АІС-КЛІМАТ» (Україна). Фільтрувальний матеріал - поліестер та спанбонд. Матеріал корпусу – оцинкована сталь. Габарити, мм: 490×490. [53]
З-11	Збірник для приготування композиція А	1	Реактор - змішувач RCP-M15L 5 л «Sartorius Stedim Biotech», Франція. Розмір апарату, мм: 700 ×900 ×1300, вага – 130 кг, матеріал корпусу - нержавіюча сталь AISI 304, обладнаний перемішувальним пристроєм – 20 -1500 об/хв. [54]
З-16	Збірник для приготування композиція А	1	Реактор - змішувач 50 л «Промвіт» (Україна). Розміри апарату, мм: 876 x 525 x 1310. Матеріал корпусу - нержавіюча сталь AISI 316 L. Має магнітну мішалку. Максимальний тиск - 3 бар, максимальна температура - 132 °С. [55]
З-21	Збірник для приготування композиція А	1	Реактор-змішувач 400 л ТОВ «ГК Єврохіммаш К.О.» (Україна). Розміри апарату, мм: 1380 x 1380 x 2530. Матеріал корпусу - корозійностійка сталь. Має перемішувальний пристрій (100 об/хв) з потужністю 2,2 кВт та сорочкою. [56]

З-9	Збірник для аміачної води	1	Збірник «SPEIDEL», Україна. Матеріал – нержавіюча сталь. Розміри збірника, см: висота – 35, діаметр – 28, вага – 5 кг. [54]
Д-8, Д- 15, Д-20	Дозатор рідин	3	Насос дозуючий SEKO MS1C138A51C4000. Максимальна продуктивність 155 л/год. Максимальний тиск 7 бар. Тип насоса - мембранний дозатор. Робочим елементом є мембрана. Компанія: «Engineering Systems» (Україна) [57]
Н-10 Н-12	Насос	2	Мембранний насос FOODBOXER 15 «Debem» (Італія). Відповідає вимогам FDA. Продуктивність насоса до 17 л/хв. Самовсмоктування до 3 м. Виготовлений зі сталі AISI 316. Компанія: «Debem» (Італія) [58]
Н-17 Н-22	Насос	2	Мембранний насос FOODBOXER 30 «Debem» (Італія). Відповідає вимогам FDA. Продуктивність насоса до 35 л/хв. Самовсмоктування до 4 м. Виготовлений зі сталі AISI 316. Компанія: «Debem» (Італія) [59]
Н-25	Насос	1	Мембранний насос FOODBOXER 50 «Debem» (Італія). Відповідає вимогам FDA. Продуктивність насоса до 60 л/хв. Самовсмоктування до 4 м. Виготовлений зі сталі AISI 316. Компанія: «Debem» (Італія) [60]
ІН-14	Інокулятор 5 л	1	Інокулятор RCP-M15L 5 л «Sartorius Stedim Biotech», Франція. Розмір апарату, мм: 700 ×900 ×1300, вага – 130 кг, матеріал корпусу - нержавіюча сталь AISI 304, обладнаний перемішувальним пристроєм – 20 -1500 об/хв, барботером та сорочкою. Потужність двигуна – 0,5кВт. [54]

ІН-19	Інокулятор 50 л	1	Біореактор об'ємом 50 л «Lab1st» (Шанхай). Всі деталі, що контактують із продуктом, виготовлені із нержавіючої сталі SUS304. Реактор виготовлений відповідно до вимог GMP. Габаритні розміри 650×650×1492 мм. Вага – 110 кг. Частота обертання якірної мішалки 50-1000 об/хв. [61]
ФР-24	Ферментер 500 л	1	Загальний об'єм ферментера 500 л «Lab1st» (Шанхай). Виготовлено з нержавіючої сталі SUS 304. Оснащений датчиками розчиненого кисню, рівня піни, рН, температури та тиску. Наявний перемішувальний пристрій 50 - 1000 об/хв та сорочка. Робочий макс. тиск 0,3 МПа. [62]

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря Забір повітря здійснюється через повітрозабірник (ПЗ-1), розміщений на висоті 10–12 м для уникнення пилу та забруднень, враховуючи висоту будівлі 5 м та обладнання (ферментер — приблизно 1,6 м).

ДР 1.2. Очищення від грубих домішок Попереднє очищення проводиться фільтром грубого очищення (Ф-2), який забезпечує ефективність очищення до 60%.

ДР 1.3. Компресування повітря Стиснення повітря здійснюється у компресорі (К-3), де повітря нагрівається до 120–200 °С. Тиск після компресора становить 0,35 МПа.

ДР 1.4. Охолодження та осушення повітря Стиснене повітря охолоджується в теплообміннику (Т-4) до 25–30 °С, після чого подається до ресивера (Р-5), де осаджуються краплі вологи та згладжуються пульсації. Вологість повітря на цьому етапі — 60–70%.

ДР 1.5. Нагрівання повітря Для запобігання конденсації, повітря подається в теплообмінник-нагрівач (Т-6), де нагрівається до 33–35 °С.

ДР 1.6. Головне очищення повітря Нагріте повітря проходить через головний фільтр (Ф-7), заповнений активованим вугіллям. Ступінь очищення — 98%.

ДР 1.7. Індивідуальне очищення Повітря подається до індивідуальних фільтрів (Ф-13, Ф-18, Ф-23), розташованих безпосередньо перед інокуляторами та ферментером. Ефективність очищення — 99,999%.

					НУХТ БТЕК 04.03.21 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ		
Розроб.		Кірда А.О			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Старовойтова С.О				60	3
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					

ДР 2. Приготування і стерилізація поживних середовищ

ДР 2.1. Колби на качалках У 750 мл колбу вносять: 3,6 г лактози, 2,7 г дріжджового екстракту, 200 мл води, 160 мл молочної сироватки. Після перемішування колби стерилізують при 112–115 °С протягом 30 хв при 0,05 МПа.

ДР 2.2. Інокулятор 5 л Зважені компоненти (36 г лактози, 27 г дріжджового екстракту) вносять до збірника 3-11. Додають 1,8 л води, 1,62 л сироватки, перемішують і стерилізують у ІН-14 при 112–115 °С, 30 хв, 0,05 МПа.

ДР 2.3. Інокулятор 50 л У 3-16 подають 317 г лактози, 237,7 г дріжджового екстракту, 15,5 л води, 14,2 л сироватки. Після змішування стерилізують у ІН-19 при 112–115 °С, 30 хв, 0,05 МПа.

ДР 2.4. Ферментер 500 л У 3-21 додають 2890 г лактози, 2167,5 г дріжджового екстракту, 140 л води, 130 л сироватки. Після змішування середовище подається до ФР-24 та стерилізується при 112–115 °С, 30 хв, 0,05 МПа.

ТП 3. Підготовка посівного матеріалу

ТП 3.1. Колекційна культура Культуру зберігають на М17 агарі при 2–4 °С, з пересівами кожні 2–3 місяці. Проводиться мікробіологічний контроль.

ТП 3.2. Робоча культура Колекційну культуру висівають на чашки Петрі з М17 агаром, інкубують при 40 ± 1 °С протягом 48 год.

ТП 3.3. Інокулят на агаризованому середовищі Ізольовані колонії пересівають у пробірки з М17 агаром, вирощують при 40 ± 1 °С, 24 год.

ТП 3.4. Колби на качалках Колби заповнюють поживним середовищем, додають суспензію клітин (0,9% NaCl), інкубують 16–18 год при 40 ± 1 °С.

ТП 3.5. Інокулятор 5 л У стерильний ІН-14 об'ємом 5 л вносять 0,36 л інокуляту. Контроль рН 6,8–7,3 здійснюється аміачним розчином через

насос Н-10. Перемішування — 70 об/хв, температура — 40 ± 1 °С, 16–18 год.

ТП 3.6. Інокулятор 50 л з ІН-14 інокулят передається в ІН-19 (50 л). рН контролюється аналогічно, перемішування — 70 об/хв, інкубація — 16–18 год при 40 ± 1 °С.

ТП 4. Виробничий біосинтез

ТП 4.1. Ферментер 500 л Інокулят з ІН-19 подається у ФР-24 з композицією А. Контроль рН — аміачним розчином (насос Н-10), перемішування — 70 об/хв, інкубація — 22–24 год при 40 ± 1 °С. Проводиться мікробіологічний контроль та визначення концентрації ГК (0,598 г/л). Культуральну рідину після завершення процесу перекачують насосом Н-25 до збірника.

РОЗДІЛ 8. ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ГІАЛУРОНОВОЇ КИСЛОТИ

У сучасній науковій літературі зазначається, що раніше гіалуронову кислоту (ГК) отримували з тваринної або людської сировини. Проте такий підхід має низку суттєвих недоліків, зокрема слабкий контроль якості вихідної сировини, ризик інфікування зоонозними патогенами, ендотоксинами та пріонами, оскільки система контролю постачання тканин на бойні є недостатньою [63].

На сьогодні переважає біотехнологічний метод одержання ГК із застосуванням мікроорганізмів. Для очищення культуральної рідини, що містить ГК, використовують методи фільтрації та адсорбції, ефективні для речовин з молекулярною масою 10^4 – 10^7 Да [65].

Гіалуронова кислота, що пройшла етапи очищення, застосовується у фармацевтичній, косметичній, харчовій промисловості, а також у виробництві медичних виробів і в галузі клітинної терапії. Через зростання попиту на безпечну та високоочищену продукцію, мікробіологічний синтез ГК є найбільш перспективним [65].

У дослідженні [65] розглянуто застосування адсорбентів (активованого вугілля та оксидів алюмінію) для підвищення ступеня очищення ГК. Схема очищення виглядає так:

- Видалення біомаси шляхом фільтрації через фільтр із порами 1,5 мкм після додавання 1–5% кізельгуру.
- Діафільтрація: розведення зразка деіонізованою водою (1:1) та подальше пропускання через касети з мембраною 30 або 50 кДа.

					НУХТ БТЕК 04.03.21 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Кірда А.О.			РОЗДІЛ 8. ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ГІАЛУРОНОВОЇ КИСЛОТИ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Старовойтова С.О.					63	4
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Додавання 2% адсорбенту та перемішування протягом 10 годин, подальша фільтрація через мембрану 0,45 мкм.

Осадження ГК шляхом додавання трьох об'ємів ацетону; фільтрація та сушіння на ситі з порами 100 мкм.

Таким чином, вихід готової сухої ГК становив близько 60% від загальної ферментованої маси [65].

В іншому дослідженні [66, 67] запропоновано альтернативну методику, що включає:

- Осадження ГК етанолом у співвідношенні 3:1, подальше центрифугування (7000 об/хв, 30 хв).
- Розчинення осаду в 0,15 М NaCl, центрифугування (3000 об/хв, 5 хв).
- Обробка трихлороцтовою кислотою (1%) та вугіллям (1–2%) при 4 °С, з подальшим центрифугуванням.
- Нейтралізація до рН 6 (NaOH 0,1%), фільтрація через мембрану 0,45 мкм.
- Завершальне висушування — ліофілізація.

Оскільки дана методика була створена спеціально для *Streptococcus thermophilus*, який використовувався як продуцент на попередніх етапах дослідження, саме вона була обрана як основна.

Висушування

У роботі [67] описано ефективний режим ліофілізації гіалуронової кислоти: охолодження при 4 °С протягом 2 годин, заморожування при –85 °С та сублімація при 110 °С протягом 1 години. Це підтверджується також термічними даними про стабільність ГК: температура її розкладу становить 220 °С, що робить процес безпечним [64].

Подрібнення

Висушену масу гіалуронової кислоти подрібнюють до дрібнодисперсного стану за допомогою кульового млина. Такий ступінь подрібнення необхідний для подальшого приготування лікарських форм розчину [63].

Просіювання

Просіювання подрібненої ГК забезпечує однорідність фракцій. У нашому випадку доцільно застосовувати вібраційний грохот [63].

Пакування

та

маркування

Пакування ГК у вигляді порошку залежить від призначення та обсягу. Використовуються:

- герметичні алюмінієві пакети по 1 кг;
- картонні коробки по 10–20 кг;
- барабани по 25 кг з подвійною внутрішньою упаковкою [68].

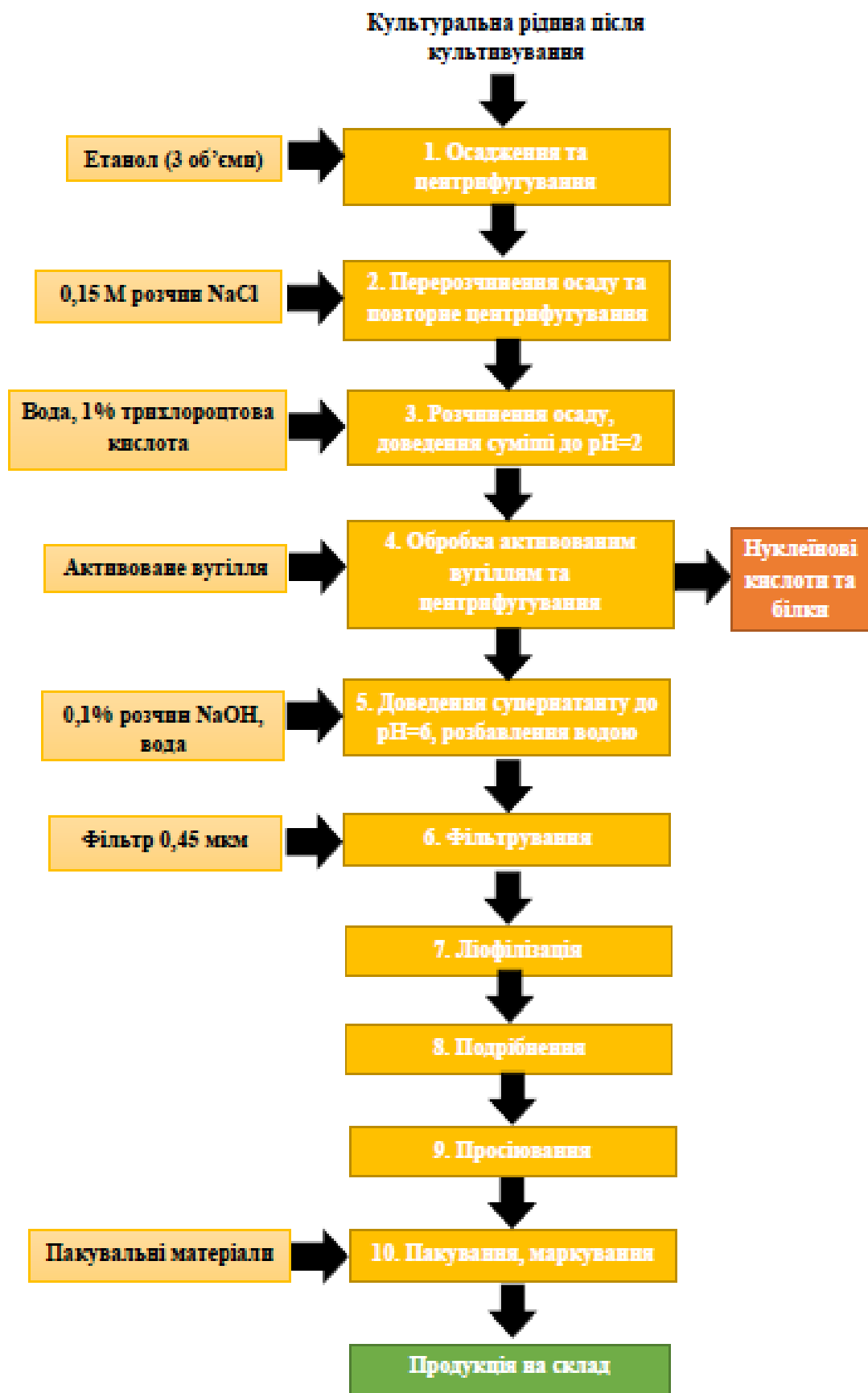
Приклади постачальників:

- *Asclepius Biotech* — фармацевтична ГК, пакування 1–25 кг [69];
- *Botanical Cube Inc.* — пакування 1–25 кг, сертифікація: ISO22000, Halal [70];
- *Pure Herb Extract* — порошок різної молекулярної маси, фасування 10 кг, сертифікати: ISO9001, Kosher [71];
- *Xi'an Green Spring* — фармацевтичний гіалуронат натрію [72].

Маркування упаковки повинно містити [73, 74]:

- назву субстанції;
- масу нетто;
- номер партії;
- дату виготовлення та термін придатності;
- умови зберігання;
- країну виробника;
- ступінь чистоти (Pharmaceutical Grade);
- стандарт якості (USP, EP, JP);
- ідентифікаційний штрихкод або QR-код.

Узагальнена схема виділення та очищення гіалуронової кислоти викладена на рис. 8.1.



РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

9.1. Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ

Одним із методів перевірки стерильності поживного середовища є метод прямого мікроскопіювання. Пряме мікроскопіювання дозволяє побачити клітини, бактерії, паразити або інші мікроорганізми в їх природному стані.

Мікроскопічне дослідження проводять у світловому мікроскопі, оснащеному імерсійною оптичною системою. Для підготовки препарату, дотримуючись умов стерильності, на очищене і знежирене предметне скло наносять краплю культурального середовища за допомогою стерильної бактеріальної петлі. Рівномірно розподіляють її по поверхні скла, після чого мазок залишають висихати при кімнатній температурі. Далі мазок фарбують за методом Грама: грампозитивні бактерії забарвлюються в синій або фіолетовий колір завдяки структурним особливостям їх клітинної стінки. На завершальному етапі, на повністю висушений препарат додають 1–2 краплі імерсійного масла за допомогою стерильної палички. [75] В полі зору під час мікроскопіювання мазка мають бути відсутні будь-які мікроорганізми

Мікробіологічний метод (прямий висів)

Для перевірки стерильності відбирають 50 мл простерилізованого поживного середовища. З цього об'єму беруть 0,1 мл і переносять на чашки Петрі з різними середовищами: сусло-агаром — для виявлення грибів та дріжджів, м'ясо-пептонним агаром — для виявлення бактерій.

					НУХТ БТЕК 04.03.21 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА					
Розроб.	Кірда А.О							Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Старовойтова С.О								67	9
Реценз.								Кафедра БТМ		
Н. Контр.										
Затверд.	Стабніков В.П.									

Після посіву чашки загортають у папір і інкубують у термостаті при температурі 30–32 °С протягом 6–8 годин. По завершенні інкубації візуально перевіряють відсутність росту мікроорганізмів на поверхні середовищ.[75]

9.2. Мікробіологічний контроль культуральної рідини і чистоти культури

Мікроскопіювання та висів

Якість посівного матеріалу визначають як методом прямого мікроскопіювання, так і висівом на чашки Петрі.

Мікробіологічний контроль культуральної рідини *S. thermophilus* здійснюють кожні 2 години шляхом мікроскопіювання з імерсією пофарбованого за Грамом зразка, а також висівом штрихом на кров'яний агар.

Також, після висіву на чашки Петрі, проводять культивування на протязі 3-5 діб, за температури 26 °С. На кров'яному агарі побачимо малі, круглі, гладкі, з опуклою поверхнею колонії. Колір колоній — білий або злегка кремовий. Навколо колоній не спостерігається змін кольору чи прозорості агару, оскільки *S. thermophilus* не виробляє гемолітичних токсинів.

Результатом мікроскопіювання посівного матеріалу має бути відсутність сторонньої мікробіоти в полі зору препарату. А також відсутність на чашках Петрі сторонніх мікробних контамінацій. При наявності сторонньої мікробіоти в посівному матеріалі його не використовують для засіву.

Під час мікроскопіювання, за відсутності сторонньої мікробіоти, спостерігаються кулясті або овальні клітини *Streptococcus thermophilus* розміром 0,7–0,9 мкм, які утворюють пари або короткі ланцюжки.[80]

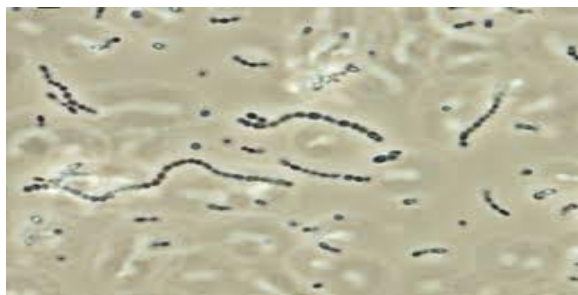


Рис. 9.1. Мікроскопія клітин *Streptococcus thermophilus*

9.3. Показники росту *S. thermophilus* і синтезу гіалуронової кислоти

9.3.1. Визначення споживання джерела карбону (лактоза) у культуральній рідині

Метод визначення концентрації лактози в культуральній рідині виконується за допомогою флуориметричного аналізу лактози (Lactose Assay Kit). Основні етапи:

- **Принцип методу:** Лактаза розщеплює лактозу на глюкозу та галактозу. Глюкоза окислюється глюкозооксидазою до D-глюконової кислоти і перекису водню. Перекис водню реагує зі специфічним флуоресцентним зондом за допомогою пероксидази хрому (HRP), що дозволяє кількісно визначити концентрацію лактози.

Підготовка зразків:

Відцентрифугувати культуральну рідину при 10,000 об/хв протягом 5 хвилин.

Використовувати супернатант для аналізу, уникати використання середовищ, що містять глюкозу чи лактозу.

Проведення аналізу:

Зразки та стандарти додаються до 96-лункового мікропланшета.

До половини зразків додається реакційна суміш, а до іншої – контрольна суміш (без лактази).

Інкубація проводиться 45-60 хвилин при 37°C у захищеному від світла середовищі.

Вимірювання:

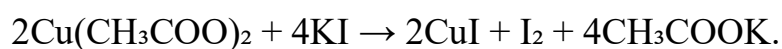
Флуоресценція вимірюється при довжині хвилі збудження 530-570 нм і емісії 590-600 нм.

Концентрація лактози визначається шляхом порівняння отриманих значень із стандартною кривою.

Цей метод дозволяє точно вимірювати концентрацію лактози в культуральній рідині завдяки високій чутливості та специфічності [78].

9.3.2. Визначення споживання азотного живлення (дріжджовий екстракт) у культуральній рідині.

Джерелом азотного живлення в поживному середовищі є дріжджовий екстракт, азот в якому міститься в амінній формі. Визначення амінного азоту мідним методом базується на здатності амінокислот і пептидів утворювати розчинні комплексні сполуки з іонами міді. Після утворення таких сполук мідь визначають кількісно за допомогою йодометричного аналізу. Суть методу полягає в тому, що до досліджуваного розчину, який містить амінокислоти та пептиди, додають надлишок суспензії фосфорнокислої міді в боратному буфері. У результаті збовтування більшість амінокислот утворюють розчинні солі з міддю. Надлишок фосфату міді видаляють фільтрацією, а до прозорого розчину додають оцтову кислоту і йодистий калій. Реакція, що відбувається, описується рівнянням:



Виділений йод титрують слабким розчином тіосульфату натрію. Кожен мілілітр 0,01 н. розчину $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ еквівалентний 0,28 мг амінного азоту.

Для проведення аналізу використовуються наступні прилади, посуд і реагенти. Для вимірювань потрібні мірні колби об'ємом 50 і 100 см³, піпетки об'ємом 5 і 10 см³, мірний циліндр об'ємом 50 см³, конічна колба об'ємом 100 см³, а також мікробюретка об'ємом 2 см³. У якості основних реактивів використовуються розчин хлориду міді (27,3 г солі розчиняється в 1 дм³ води), розчин фосфату натрію (64,5 г гідроортофосфату натрію NaH_2PO_4 розчиняється в 500 см³ дистильованої води, до якого додається 7,2 г гідроксиду натрію і доводиться об'ємом до 1 дм³), а також боратний буферний розчин (57,21 г бури розчиняється в 1,5 дм³ води, додається 100 см³ розчину соляної кислоти концентрацією 1 моль/дм³ і доводиться до 2 дм³ води). Для приготування суспензії фосфату міді змішують 1 об'єм розчину хлориду міді з 2 об'ємами

розчину фосфату натрію і додають 2 об'єми боратного буферного розчину (суспензія зберігається не більше 3 днів).

Для індикації використовують розчин тимолфталеїну (0,25 г індикатора розчиняється в 100 см³ 50%-го спирту), розчин тіосульфату натрію з концентрацією 0,01 моль/дм³, а також 1%-й розчин крохмалю. Для підкислення використовують 80%-ву або крижану оцтову кислоту, а для титрування додають розчин гідроксиду натрію концентрацією 1 моль/дм³ і 10%-й розчин йодиду калію.

Для визначення амінного азоту використовують наступну методику. Спочатку в мірну колбу об'ємом 50 см³ піпеткою вносять 5 см³ дослідного розчину, після чого додають 3-4 краплини індикатора тимолфталеїну. Потім поступово додають розчин гідроксиду натрію (0,1 моль/дм³) до тих пір, поки розчин не набуде блідно-блакитного забарвлення. Далі до слабколужного розчину додають 30 см³ суспензії ортофосфату міді, після чого вміст колби доводять до мітки дистильованою водою та ретельно перемішують. Потім фільтрують через паперовий фільтр, отримуючи прозорий фільтрат.

10 см³ цього фільтрату переносять у фарфорову чашку або конічну колбу. Додають 0,5 см³ 80%-ї оцтової кислоти для підкислення і 10 см³ розчину йодату калію. Після перемішування йод, що виділився, титрують розчином тіосульфату натрію (0,01 моль/дм³), використовуючи мікробюретку. В кінці титрування додають 1-2 краплини розчину крохмалю. Кінець титрування визначають за відсутністю синього забарвлення після додавання однієї краплі тіосульфату натрію.

Для обчислення кількості амінного азоту в 10 см³ фільтрату необхідно помножити витрачену кількість тіосульфату натрію на 0,28, враховуючи розведення, що еквівалентно 1 см³ суслу. Вміст амінного азоту X можна розрахувати за формулою:.

Результати обчислюють за формулою:

$$X = ((a - b) \times 0,28) / n,$$

де **X** – вміст амінного азоту (мг/л), **a** – об'єм 0,01 н. Na₂S₂O₃, витрачений на титрування дослідного зразка (мл), **b** – об'єм 0,01 н. Na₂S₂O₃, витрачений на титрування контрольного зразка (мл), **n** – кількість досліджуваного розчину, взятого для аналізу (мл).

Цей метод є високоточним і підходить для аналізу складних сумішей, що містять амінокислоти й пептиди. [79]

9.3.3. Визначення концентрації гіалуронової кислоти у культуральній рідині

Для визначення концентрації гіалуронової кислоти у культуральній рідині застосовується колориметричний метод з використанням карбазолової проби. Цей метод базується на реакції глюкуронової кислоти (GlcA), що входить до складу ГК, із карбазоловим реагентом у присутності сірчаної кислоти, що призводить до утворення кольорового комплексу, вимірюваного спектрофотометрично при довжині хвилі 523 нм.

Методика проведення аналізу

Підготовка проб

Відібрання 200 мкл культуральної рідини з дослідних зразків.

Додавання 3 мл 0,025 М тетраборату натрію у сірчаній кислоті.

Інтенсивне перемішування проб протягом 10 секунд.

Інкубація

Проби нагріваються до 100°C протягом 10 хвилин.

Після охолодження додається 100 мкл 0,0125% розчину карбазолу в етанолі.

Реакція активується повторним нагріванням при 100°C протягом 15 хвилин.

Вимірювання результатів

Оптична щільність зразків вимірюється за допомогою спектрофотометра UV-31 SCAN ONDA при 523 нм.

Контрольний зразок складається з буферного розчину без ГК.

Додаткові матеріали та реагенти

Для точності вимірювання та стандартного аналізу необхідні такі матеріали та обладнання:

Хімічні реагенти:

Глюкуронова кислота (GlcA) – для побудови калібрувальної кривої.

Карбазол ($C_{12}H_{10}N_2O$) – реагент для утворення кольорового комплексу.

Сірчана кислота (H_2SO_4 , 98%) – основний компонент для реакції.

Тетраборат натрію ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) – необхідний для забуферювання середовища.

Етанол (96%) – розчинник для карбазолу.

Лабораторне обладнання:

Спектрофотометр UV-31 SCAN ONDA – для вимірювання оптичної щільності.

Мікропіпетки (100-1000 мкл) – для точного дозування реагентів.

Центрифуга (10 000 об/хв) – для очищення проб перед аналізом.

Водяна баня (100°C) – для проведення нагрівальних стадій реакції.

Скляні кювети (10 мм оптична довжина) – для вимірювань у спектрофотометрі.

Інтерпретація даних

Визначення концентрації ГК у зразках проводиться шляхом побудови калібрувальної кривої за стандартними розчинами глюкуронової кислоти. Отримані результати дозволяють оцінити ступінь синтезу або деградації ГК у досліджуваних культуральних середовищах [81]

9.3.4. Визначення концентрації біомаси

Для визначення концентрації біомаси *Streptococcus thermophilus* беруть пробу культуральної рідини 1 мл. Вимірюють його оптичну густину за допомогою спектрофотометра. Кювети обираємо з довжиною оптичного шляху 10 мм. Для контролю в іншу кювету наливаємо

стерильну воду. Прилад ULAB 102 вимірює довжину хвилі на 600 нм (рис. 5.2). Далі за допомогою калібрувального графіка розраховуємо біомасу бактерій .

Нефелометричний метод, використовується для визначення концентрації частинок у рідині шляхом вимірювання розсіяння світла. Цей метод часто застосовується в хімічному аналізі, біохімії та клінічних лабораторіях для вимірювання концентрацій білків, антитіл, антигенів, та інших молекул у зразках.

Основні принципи нефелометричного методу:

Розсіяння світла: Коли світло проходить через рідину, яка містить зважені частинки, ці частинки розсіюють світло. Інтенсивність розсіяного світла пропорційна кількості і розміру частинок у розчині.

Вимірювання інтенсивності: Спектрофотометр вимірює інтенсивність світла, яке розсіюється під кутом до первинного променя. Зазвичай вимірювання проводять під кутом 90° до падаючого світла.

Калібрування: Для визначення концентрації частинок у зразку використовуються калібрувальні криві, створені на основі відомих концентрацій стандартних зразків.

Переваги нефелометричного методу:

Висока чутливість: Метод дозволяє виявляти низькі концентрації частинок у зразках.

Швидкість: Аналіз можна провести швидко, що особливо важливо у клінічних та промислових застосуваннях.

Невеликий обсяг зразка: Для аналізу потрібно лише невелика кількість рідини.

Недоліки нефелометричного методу:

Інтерференції: Присутність інших частинок або забруднювачів може впливати на точність вимірювання.

Вимоги до чистоти зразка: Для точних результатів необхідно, щоб зразок був максимально чистим і не містив сторонніх частинок. [82]



Рис. 9.3. Спектрометр ULAB 102 [82]

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Артроз (остеоартрит) [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://kinesislife.ua/lechenie/zabolevaniya-sustavov/artroz>
2. Abatangelo G., Vindigni V., Avruscio G., Pandis L., Brun P. (2020). Hyaluronic Acid: Redefining Its Role. *Cells*, 9(7):1743. <https://doi.org/10.3390/cells9071743>
3. Вирва, О. Є., Ашукіна Н.О. (2018). Препарати гіалуронової кислоти в лікуванні патології опорно-рухової системи (огляд літератури). *ORTHOPAEDICS, TRAUMATOLOGY and PROSTHETICS*, (1), 117–124.
4. Walvekar P., Lulinski P., Kumar P., Aminabhavi T.M., Choonara Y.E. (2024). A review of hyaluronic acid-based therapeutics for arthritis. *Int J Biol Macromol.*, 264(Pt 2):130645. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130645>
5. Зайченко Г. В. та ін. (2017). Аспекти фармакодинаміки гіалуронової кислоти. *Вісник проблем біології і медицини*, 1(135), 33–42.
6. Gibbs A.J. та ін. (2023). Recommendations for hip and knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 31(10):1280–1292. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2023.05.015>
7. de Roy L. та ін. (2023). Impact of hyaluronic acid injection. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 31(12):5554–5564. <https://doi.org/10.1007/s00167-023-07602-w>
8. Страфун С. С., Яременко О. Б. (2022). Сучасні підходи до лікування суглобів. *Здоров'я України*, 5. <https://rheumahub.org.ua/>
9. Вирва, О. Є., Ашукіна Н.О. (2018). Препарати гіалуронової кислоти... *ORTHOPAEDICS...*, (1), 117–124.
10. Воловар О. С. та ін. (2013). Препарати гіалуронової кислоти при СНЩС. *Український хіміотерапевтичний журнал*, (3–4), 39–42.

11. Внутрішньосуглобове введення гіалуронової кислоти. [Електронний ресурс]. <https://surl.li/vsnyoz>
12. Внутрішньосуглобова терапія – ефективний шлях. [Електронний ресурс]. <https://surl.li/ftglhn>
13. Abbas Mohammed A., Niamah A. K. (2022). *S. thermophilus* & hyaluronic acid. *Archives of Razi Institute*, 77(6), 2395–2405. <https://doi.org/10.22092/ARI.2022.358612.2262>
14. Chen H. та ін. (2016). Optimized medium for *S. thermophilus*. *Carpathian J. of Food Sci & Tech*, 8(2), 38–44.
15. Han M. (2022). Milk fermentation with *S. thermophilus*. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1097013>
16. Uriot, O., Denis, S., Junjua, M., Roussel, Y., Dary-Mourot, A., & Blanquet-Diot, S. (2017). *Streptococcus thermophilus*; from yogurt starter to a new promising probiotic. *Journal of Functional Foods*, 37, 74-89
17. *Streptococcus thermophilus* - [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://ua.fengchengroup.net/enzymes-and-bio-products/probiotics/streptococcus-thermophilus-streptococcus.html>
18. *Streptococcus thermophilus* - [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://klublr.com/ena/streptococcus-thermophilus-plate>
19. Markakiou, S., Gaspar, P., Johansen, E., Zeidan, A. A., & Neves, A. R. (2020). Harnessing the metabolic potential of *Streptococcus thermophilus* for new biotechnological applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 61, 142-152.
20. Артроз (остеоартрит) – поглиблений опис. [Електронний ресурс]. <https://kinesislife.ua/>
21. Vyrva, O., Ashukina, N. (2018). Hyaluronic acid in orthopedic practice. *ORTHOPAEDICS, TRAUMATOLOGY and PROSTHETICS*, (1), 117–124.

22. Воловар О. С., Маланчук В. О., Крижанівська О. О. (2013). Гіалуронова кислота при СНЩС. *Український хіміотерапевтичний журнал*, (3–4), 39–42.
23. Введення гіалуронової кислоти у суглоби. [Електронний ресурс]. <https://rivne.oxford-med.com.ua/>
24. Внутрішньосуглобова терапія – ефективний підхід [Електронний ресурс].. <https://policlinika.com.ua/>
25. Ін'єкція гіалуронової кислоти. [Електронний ресурс]. <https://medicalcairednepr.com/>
26. Гіалган – розчин для ін'єкцій. [Електронний ресурс]. <https://tabletki.ua/>
27. Ostenil Plus – гіалуронова кислота. [Електронний ресурс]. <https://artroz.com.ua/>
28. Дьюралан 60 мг/3 мл №1 – 6500 грн [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://meddostavka.net/products/durolane/>
29. Thermophilus Isolates. *Archives of Razi Institute*, 77(6), 2395–2405. <https://doi.org/10.22092/ARI.2022.358612.2262>
30. Основи проектування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: метод. рекомендації... – К.: НУХТ, 2022. – 79 с.
31. Glycolysis / Gluconeogenesis – *Streptococcus thermophilus* CNRZ1066 [Електронний ресурс]. <https://www.kegg.jp/pathway/stc00010>
32. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підручник. — 2-ге вид., доп. і перероб. — К.: НУХТ, 2010. – 632 с.
33. Izawa N., Serata M., Sone T., Omasa T., Ohtake H. (2011). Hyaluronic acid production by recombinant *S. thermophilus*. *J. of Bioscience and Bioengineering*, 111(6), 665–670. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.02.005>
34. Streptococcus thermophilus [Wikipedia]. https://en.wikipedia.org/wiki/Streptococcus_thermophilus

35. Cui Y., Xu T., Qu X., Hu T., Jiang X., Zhao C. (2016). Production characteristics of *S. thermophilus*. *Int. J. Mol. Sci.*, 17(10), 1701.
36. Юрченко, Е. В. (2021). Виробництво бактеріальної закваски Біфідолакт. [Магістерська дис. КПІ ім. Ігоря Сікорського].
37. СТ-Н МОЗУ 42-4.0/1:2023. Лікарські засоби. Належна виробнича практика. Додаток 1.
38. WHO guidelines on GMP for biological products [Електронний ресурс]. <https://www.who.int/...>
39. Нікітченко О. Ю. Конспект лекцій з дисципліни «Виробнича санітарія». – Харків: ХНУМГ, 2015. – С. 50.
40. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв. –К.: НУХТ, 2022. – 373 с.
41. Настанова "Лікарські засоби. Належна виробнича практика. СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2020" [Електронний ресурс]. <https://www.dls.gov.ua/...>
42. Інструкція ПРАЙМДЕЗИМ – дезінфекційний засіб [Електронний ресурс]. <https://dezmed.com.ua/>
43. Інструкція САНІТАБ – дезінфекційний засіб [Електронний ресурс]. <https://interdez.com.ua/>
44. Safety Data Sheet EndoQuick [Електронний ресурс]. <https://content.olympusamerica.com/>
45. Sterillium Classic Pure, 5л – антисептик [Електронний ресурс]. <https://vdsstomat.com.ua/>
46. НЕОСТЕРИЛ М – антисептик [Електронний ресурс]. <https://interdez.com.ua/>
47. Повітрозабірник Navyflex [Електронний ресурс]. <https://aes.in.ua/>

48. Вентиляційне обладнання [Електронний ресурс].
<https://ukrvent.com/>
49. Центробіжні компресори Dalgakiran [Електронний ресурс].
<https://dalgakiran.ua/>
- 50.осушитель стисненого повітря [Електронний ресурс].
<https://unisol.in.ua/>
51. Ресивер для стисненого повітря [Електронний ресурс].
<https://elmag-ua.com/>
52. Повітронагрівач аналог КСК [Електронний ресурс].
<https://tenorio.group/>
53. Кишеньковий фільтр тонкої очистки [Електронний ресурс].
<https://air-klimat.prom.ua/>
54. Ємність універсальна 15 л [Електронний ресурс].
<https://prolitech.com.ua/...>
55. Реактор для ін'єкційних розчинів RS-50 [Електронний ресурс].
<https://promvit.com.ua/>
56. Апарати з емалевим покриттям [Електронний ресурс].
<https://euromash.kiev.ua/>
57. Насос SEKO дозуючий [Електронний ресурс].
<https://dosingtech.com.ua/...>
58. Насос харчовий Foodboxer 15 [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.debem.com.ua/nasos/piwevye_nasosy/foodboxer_15/
59. Насос харчовий Foodboxer 30 [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.debem.com.ua/nasos/piwevye_nasosy/foodboxer_30/
60. Насос харчовий Foodboxer 50 [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.debem.com.ua/nasos/piwevye_nasosy/foodboxer_50/

61. Lab1st Bioreactor 50L – технічна документація [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://files.lab1st.com/documents/BR500-C1-50L%20Lab1st%20Bioreactor%20V1.231025.pdf>
62. Lab1st Bioreactor 500L – технічна документація [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://files.lab1st.com/documents/BR500-C1-500L%20Lab1st%20Bioreactor%20V1.231025.pdf>
63. Грищенко М. І., Старовойтова С. О. (2024). Економічні, технологічні та нормативні аспекти глікозаміногліканів біотехнологічного походження. *Наукові праці НУХТ*, 30(1), 51—67. <https://doi.org/10.24263/2225-2924-2024-30-1-3>
64. Choi S. та ін. (2014). Biocompatibility of fermented hyaluronic acid. *Biomaterials Research*, 18(6). <https://doi.org/10.1186/2055-7124-18-6>
65. Abbas Mohammed A., Niamah A. K. (2022). Production and Optimization of Hyaluronic Acid from *S. thermophilus*. *Archives of Razi Institute*, 77(6), 2395–2405. <https://doi.org/10.22092/ARI.2022.358612.2262>
66. Mohammed A., Niamah A. (2021). Antioxidant activity of hyaluronic acid. *Materials Today: Proceedings*, 60. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.12.038>
67. Isago Y. та ін. (2014). Freeze-dried skin care with HA and γ -PGA. *Open Journal of Regenerative Medicine*, 3, 45–53. <https://doi.org/10.4236/ojrm.2014.33006>
68. Cardenas G. та ін. (2017). Hyaluronic Acid with Metal Nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2017/9573869>
69. Factory Price Hyaluronic Acid – Asclepius Biotech [Електронний ресурс]. <https://www.asclepius-biotech.com/>

70. Hyaluronic Acid / Sodium Hyaluronic Acid Powder – BotanicalCube [Електронний ресурс]. [https://www.botanicalcube.com/...](https://www.botanicalcube.com/)
71. Hyaluronic Acid Powder – PureHerbExtract [Електронний ресурс]. <https://www.pureherbextract.com/>
72. Hyaluronic Acid Powder – Xi'an Green Spring [Електронний ресурс]. <https://www.xa-gs.com/>
73. WHO TRS No. 902 (2002). Guidelines on packaging for pharmaceutical products [Електронний ресурс]. <https://cdn.who.int/>
74. FDA Regulation 21 CFR Part 201 – Labeling [Електронний ресурс]. <https://www.ecfr.gov/>
75. Красінько В.О. (2019). Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв. – К.: НУХТ. – 252 с.
76. Guerra N. P. та ін. (2010). Enterococcus faecium growth modeling. *J. Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2010/290286>
77. Скроцька О.І., Красінько В.О., Волошина І.М. (2021). Мікроорганізми як біоагенти: лаб. практикум. – К.: НУХТ. – 15 с.
78. Manual, P. Lactose Assay Kit [Електронний ресурс]. <https://www.cellbiolabs.com/>
79. Куц А. М., Бондар М. В., Булій Ю. В. (2012). Загальні технології харчової промисловості.
80. Sciabica S. та ін. (2021). Cross-linked hyaluronic acid for pharma. *Pharmaceutics*, 13(10), 1672. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101672>
81. Uriot O., Denis S., Junjua M., Roussel Y., Dary-Mourot A., Blanquet-Diot S. (2017). *Streptococcus thermophilus*: functional and probiotic potential. *Journal of Functional Foods*, 37, 74–89.
82. Спектрофотометр ULAB-102 [Електронний ресурс]. <https://spectrolab.com.ua/ua/p17807685-spektrofotometr-ulab-102.html>

83. Юлевич О. І. Загальна біотехнологія : метод. рекомендації щодо розрахунків критеріїв ефективності біотехнологічних процесів/ О.І. Юлевич. – Миколаїв, нац. аграр. ун-т, 2017.

ДОДАТКИ

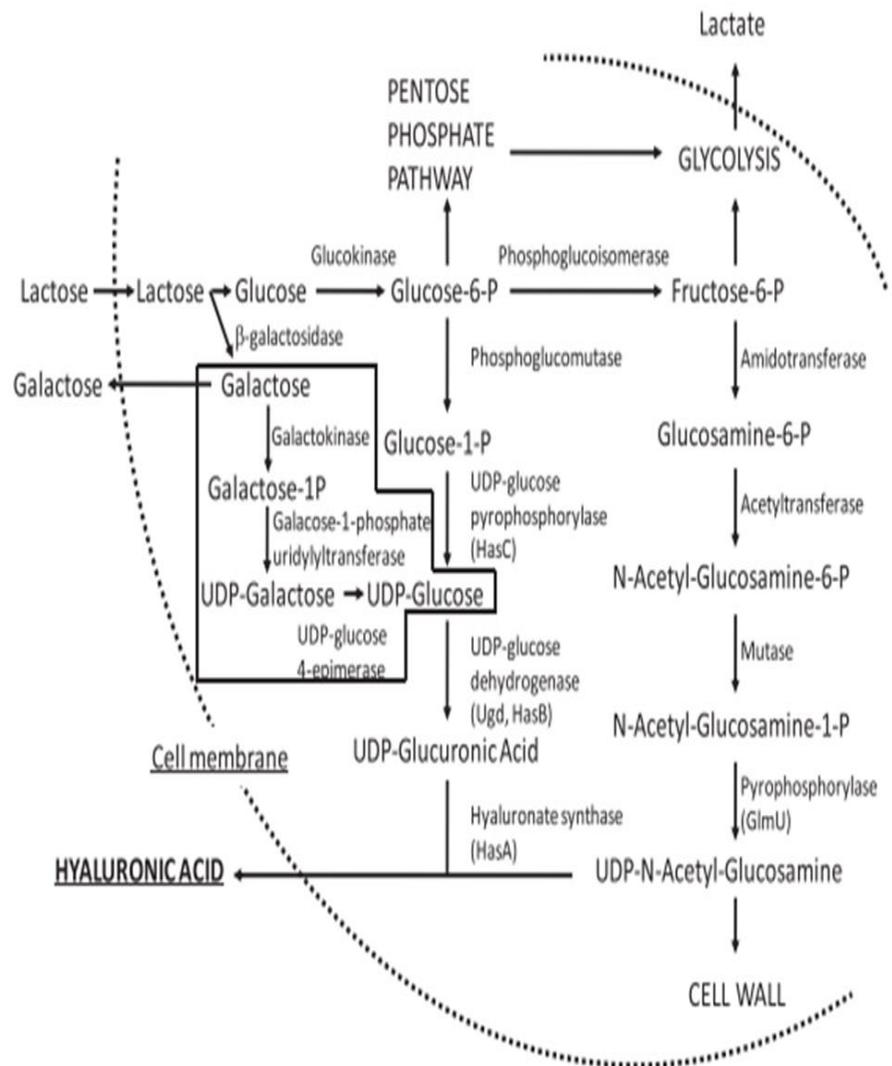
Додатки до розділу 2

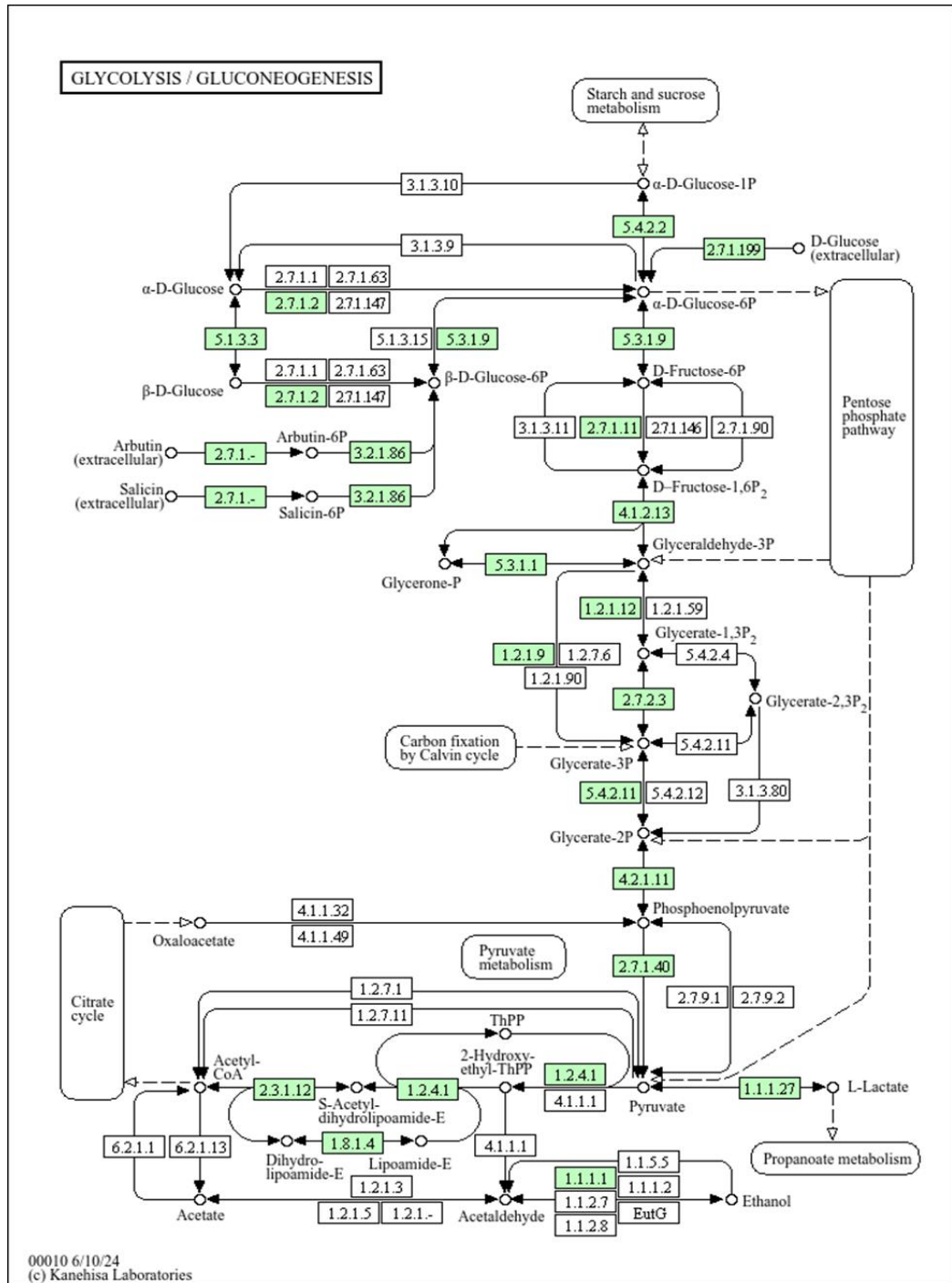
Додаток 1

Склад середовища та умови культивування

Abstract

Biopolymers, particularly exopolysaccharides produced by microorganisms such as bacteria, yeasts, and algae, have gained popularity in recent years due to their physical, chemical, and functional properties that are widely useful in food, industrial, cosmetic, and pharmaceutical systems. Hyaluronic acid is one type of these polysaccharide. This study investigated the optimal conditions for producing hyaluronic acid from the *Streptococcus thermophilus* bacterial strain. The isolated *Streptococcus thermophilus* were cultured on MRS broth, Skim milk, and M17 broth with an addition of 1% lactose. The diagnosed bacterial strains were grown in 100 ml of culture media, placed in volumetric flasks of 250 ml capacity, and incubated at 42°C for 24 hours, pH 6.8, inoculum volume 1%, and a vibrating incubator at 150 rpm. After the end of the fermentation period, the isolation and purification of HA have performed accordingly: proteins were removed using 1% trichloroacetic acid (TCA), and HA in the supernatant was collected by isopropanol precipitation. The collected HA was dialyzed against ultrapure water and lyophilized. The amount of acid produced was estimated. The results show that the best production of hyaluronic acid was from the *S. thermophilus* bacterial strain grown on the alternative medium containing whey at a ratio of 450 ml/L and 7.5 g/L yeast extract at 40 °C, with a 3% of inoculum volume and 102×10^8 colony-forming units/ml of bacterial cells, in pH 6.8 and agitation speed of 150 rpm for 18 h, which had the most significant effect on the fermentation process and gave the highest value of HA production of 0.598 g/L and biomass of 6.08 g/L. These results showed the best production method for HA to achieve maximal production yielded.





Дезінфекційний засіб «ПРАЙМДЕЗИМ»

ІНСТРУКЦІЯ для застосування дезінфекційного засобу ПРАЙМДЕЗИМ



розчин зеленого кольору з приємним запахом ароматизатора. Густина (20 °C) – 1,015–1,025 г/см³; індекс рефракції(% Вгх) – 45,00–50,00; значення рН концентрованого розчину (20 °C) – 5,00–6,00. Засіб добре змішується з водою і застосовується у вигляді робочих розчинів. Засіб має досконалі дезінфікуючі та м'яючі властивості завдяки синергічній дії активно-діючих речовин, детергентів та протеолітичних ферментів, що дозволяє ефективно та швидко в одній процедурі знищувати мікроорганізми та видаляти органічні забруднення. Водні розчини прозорі, практично без запаху. Робочі розчини видаляють забруднення будь-якого походження (включаючи білкові, жирові, залишки крові, лікарських препаратів тощо) із зовнішніх поверхонь, внутрішніх каналів та порожнин виробів медичного призначення (ВМП), гомогенізують біологічні виділення. Робочі розчини засобу не містять окислювачів, не викликають корозії, що дозволяє використовувати їх для обробки виробів, з нержавіючої сталі, алюмінію, латуні, міді, титану, полівінілхлориду, поліетилену високої щільності, поліпропілену, оргскла, полікарбонату, акрилонітрилбутадієнстиролу, тетрафторетиле-ну, поліуретану тощо. Робочі розчини засобу не ушкоджують вироби та інструменти, що потребують обережного ставлення, що дозволяє використовувати його для обробки мікрохірургічних інструментів, гнучких та жорстких ендоскопів та виробів з оптикою. Засіб добре змивається, не утворює нальоту, не фіксує органічні забруднення. Низьке піноутворення дозволяє використовувати засіб для миття та дезінфекції інструментів в ультразвукових автоматичних приладах. Засіб не відноситься до категорії горючих та вибухонебезпечних.

ІНСТРУКЦІЯ для застосування дезінфекційного засобу ПРАЙМДЕЗИМ

1. ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

1.1. Повна назва засобу – засіб дезінфекційний ПРАЙМДЕЗИМ.

1.2. Фірма-виробник – ТОВ «ПРАЙМДЕЗ» (Україна) за ТУ У 20.2-24923956-004:2021 із сировини «CHRISTEYNS FRANCE SA» (Франція). Засіб виготовлений за вимогами ISO : 9001 та проконтрольований за вимогами ДСТУ ISO/IEC 17025 «Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій»

1.3. Склад засобу, вміст діючих та допоміжних речовин, %(за масою): діючі речовини:

дидецилдиметиламоній хлорид – 26,60–29,40; N-(3-амінопропіл)-N-додецилпропан-1,3-діамін – 2,85–3,15; допоміжні речовини: фермент протеаза, детергенти та інші функціональні речовини згідно формули, засобу вода – до 100,0 %.

1.4. Форма випуску та фізико-хімічні властивості засобу

ПРАЙМДЕЗИМ – рідкий ферментний дезінфекційний засіб, що випускається у вигляді концентрованого розчину. Це прозорий

1.5. Призначення засобу

Засіб ПРАЙМДЕЗИМ призначений для професійного застосування з метою:

- дезінфекції, достерилізаційного очищення, суміщених процесів дезінфекції та до-стерилізаційного очищення ВМП, виготовлених з різних матеріалів, включаючи оглядові, хірургічні (у тому числі мікрохірургічні), офтальмологічні, стоматологічні (у тому числі ендодонтічні, а також такі, що обертаються) інструменти, тощо жорстких і гнучких ендоскопів та інструментів до них при інфекціях бактеріальної, вірусної та грибової етіології;
- дезінфекції високого рівня ВМП включаючи гнучкі ендоскопи;
- попереднього очищення виробів медичного призначення;
- для стерилізації інструментарію та інших ВМП, включаючи гнучкі та жорсткі ендоскопи;
- проведення поточної, заключної та профілактичної дезінфекції у:
 - закладах охорони здоров'я (хірургічні, реанімаційні, терапевтичні, акушерські, гінекологічні, неонатологічні, офтальмологічні, фізіотерапевтичні, патологоанатомічні та інші відділення лікувально-профілактичних закладів; стоматологічні клініки, амбулаторії, поліклініки; реабілітаційні, перинатальні, репродуктивні центри, центри паліативної медицини; клінічні, біохімічні, серологічні, бактеріологічні, вірусологічні, імунологічні та інші профільні діагностичні лабораторії; станції швидкої та невідкладної медичної допомоги; донорські пункти, пункти та центри переливання крові, хоспіси, лабораторні центри тощо);
 - медико-санітарних частинах, фельдшерсько-акушерських та медичних пунктах, тощо; оздоровчих закладах (санаторії, профілакторії тощо);
 - інших епідемічно значимих об'єктах, діяльність яких вимагає проведення дезінфекційних робіт згідно із діючими санітарно-гігієнічними та протиепідемічними нормами і правилами, нормативно-методичними документами.

1.6. Спектр антимікробної дії

Мікробіологічна ефективність засобу ПРАЙМДЕЗИМ

Найменування збудника, стандарти мікробіологічних досліджень	Концентрація, %	Експозиція, хв
Бактерицидна дія згідно EN 1040 (P. aeruginosa, S. aureus), EN 13727 (P. aeruginosa, S. aureus, E. hirae)	0,2	5
Бактерицидна дія згідно EN 14561 (P. aeruginosa, S. aureus, E. hirae)	0,4	5
Бактерицидна дія (Klebsiella pneumoniae)	0,5	5
Туберкулоцидна дія згідно EN 14348 (M. terrae)	0,5	15
Туберкулоцидна дія згідно EN 14563 (M. terrae)	1,0	15
Туберкулоцидна дія згідно EN 14348 (M. tuberculosis)	0,5	5
Фунгіцидна дія EN 1275 (Candida albicans)	0,2	5
Фунгіцидна дія згідно EN 13624, EN 14562 (Candida albicans)	0,4	5
Віруліцидна дія згідно EN 14476, (ефективність щодо оболонко-вих вірусів, PRV - модель вірусу гепатиту В, BVDV- модель вірусу гепатиту С)	0,2	5
Віруліцидна дія згідно EN 14476, (ефективність щодо оболонко-вих вірусів, вакцинний вірус)	0,4	5
Віруліцидна дія згідно EN 14476 (ефективність щодо безоболонкових вірусів, аденовірус тип 5)	0,5	15
Віруліцидна дія згідно EN 14476 (ефективність щодо безоболонкових вірусів, поліовірус тип 1)	0,5	30
	1,0	15
Спороцидна активність (B. subtilis)	3,0	60
	4,0	30

Засіб ПРАЙМДЕЗИМ має:

бактерицидні властивості, у тому числі відносно P.aeruginosa, S.aureus, E.hirae, K.pneumoniae та ін., (атестований згідно з Європейськими стандартами EN 1040, EN 13727, EN 14561);

спороцидні властивості, у тому числі відносно B.subtilis;

фунгіцидні властивості, у тому числі відносно грибів роду Candida та ін. (атестований згідно з Європейськими стандартами EN 1275, EN 13624, EN 14562);

туберкулоцидні властивості, у тому числі відносно *M.tuberculosis*, *M.terrae* (атестований згідно з Європейськими стандартами EN 14348, EN 14563);

віруліцидні властивості, у тому числі відносно: **оболонкових вірусів**, таких як, віруси гепатиту В та С, вакциніявірус, герпесвірус, ВІЛ, коронаві-рус, Т-лімфотропний вірус людини, вірус грипу, параміксовіруси (вкл. вірускору, вірус парагрипу, респіраторний синцитіальний вірус, вірус епідемічного паротиту) та ін.; **безоболонкових вірусів**, таких як, поліо- та аденовіруси, вірус гепатиту А, рота-, норо-, ентеровіруси (вкл. віруси Коксакі) та ін. (атестований згідно з Європейськими стандартами EN 14476).

1.7. Токсичність та безпечність засобу

За параметрами гострої токсичності засіб ПРАЙМДЕЗИМ при надходженні дошлунку відноситься до 3 класу небезпечності, при нанесенні на шкіру – до 4 класу небезпечності (згідно класифікації, наведеної у Наказі МОЗ України №1596 від 14.07.2020 р., «Про затвердження гігієнічних регламентів допустимого вмісту хімічних і біологічних речовин у повітрі робочої зони»). Засіб у вигляді концентрату при надходженні на шкіру та слизові оболонки очей спричиняє їх подразнення, при інгаляційному впливові може призводити до подразнення дихальних шляхів. Робочі розчини засобу не проявляють подразнюючої дії на шкіру та слизові оболонки очей, не становлять інгаляційної небезпеки.

2. ПРИГОТУВАННЯ РОБОЧИХ РОЗЧИНІВ

2.1. Методика та умови приготування робочих розчинів

Робочі розчини засобу ПРАЙМДЕЗИМ готують шляхом розведення концентрату у холодній або теплій воді (не вище +30 °С) при перемішуванні. Розчини готують у промаркованій емальованій (без пошкоджень), скляній, пластмасовій тарі, яка закривається кришкою. Робочі розчини засобу готують згідно з розрахунками, наведеними в табл. 1. Для зручності приготування робочих розчинів можна використовувати:

- дозовані флакони на 25 мл засобу. Розчиняючи вміст 1 флакону у 5 л води, одержують робочий розчин з концентрацією 0,5 %;
- вбудовані дозуючі пристрої на 30 мл у флаконах місткістю 1 л, градуйовані по 5, 10, 15, 20, 30 мл.

2.2. Розрахунки для приготування робочих розчинів

Робочі розчини засобу готують, виходячи із розрахунку, наведеного в табл. 1.

Таблиця 1. Розрахунки для приготування робочих розчинів засобу ПРАЙМДЕЗИМ

Концентрація робочого розчину (за засобом), %	Об'єм розчину, л							
	1,0		5,0		8,0		10,0	
	Об'єм концентрату, мл	Об'єм води, мл	Об'єм концентрату, мл	Об'єм води, мл	Об'єм концентрату, мл	Об'єм води, мл	Об'єм концентрату, мл	Об'єм води, мл
0,2	2,0	998,0	10,0	4990	16,0	7984	20,0	9980,0
0,4	4,0	996,0	20,0	4980,0	32,0	7968,0	40,0	9960,0
0,5	5,0	995,0	25,0	4975,0	40,0	7960,0	50	9950,0
1,0	10,0	990,0	50,0	4950,0	80,0	7920,0	100,0	9900,0
3,0	30,0	970,0	150,0	4850,0	240,0	7760,0	300,0	9700,0
4,0	40,0	960,0	200,0	4760,0	320,0	7680,0	400,0	9600,0

2.3. Термін та умови зберігання робочого розчину. Термін придатності робочих розчинів – 7 діб за умови зберігання у щільно закритій промаркованій тарі за кімнатної температури. Допускається багаторазове використання робочих розчинів для дезінфекції, суміщених процесів дезінфекції та достерилізаційного очищення, дезінфекції високого рівня та стерилізації протягом терміну придатності робочих розчинів (якщо їх зовнішній вигляд не змінився: зміна кольору, поява осаду, помутніння, зміна запаху). При перших ознаках зміни зовнішнього вигляду розчин необхідно замінити.

Таблиця 2. Режими дезінфекції об'єктів розчинами ПРА Й М Д ЕЗИ М при інфекціях різної етіології

Об'єкти знезараження	Концентрація робочого розчину (за засобом), %	Бактерицидна активність		Туберкулоцидна активність		Фунгіцидна активність, <i>Candida albicans</i>	Експозиція, хв			
		<i>E. hirae, S. aureus, P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. terrae</i>		Віруліцидна активність			
							Оболонкові		Безоболонкові	
							Вірус гепатиту В та С	Вакцинія вірус	Аденовірус	Поліовірус
Вироби медичного призначення, у тому числі інструменти виготовлені з металів та їх сплавів, скла, гуми та інших нестійких до корозії та стійких до корозії матеріалів. Гнучкі і жорсткі ендоскопи та інструменти до них. Предмети догляду за хворими.	0,2	-	-	-	-	5	-	-	-	
	0,4	5	-	-	-	5	-	5	-	
	0,5	-	5	5	15	-	-	-	15	
	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	
Інструменти та обладнання, що використовуються в фармацевтичній, мікробіологічній та кометичній промисловості.	0,2	-	-	-	-	5	-	-	-	
	0,4	5	-	-	-	5	-	5	-	
	0,5	-	5	5	15	-	-	-	15	
	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	
Перукарський, косметологічний та манікюрний інструментарій.	0,2	-	-	-	-	5	-	-	-	
	0,4	5	-	-	-	5	-	5	-	
	0,5	-	5	5	15	-	-	-	15	
	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	
Поверхні приміщень (підлога, стіни, двері, тверді меблі, прилади, устаткування тощо)	0,2	-	-	-	-	5	-	-	-	
	0,4	5	-	-	-	5	-	5	-	
	0,5	-	5	5	15	-	-	-	15	
	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	

6. ПАКУВАННЯ. ТРАНСПОРТУВАННЯ. ЗБЕРІГАННЯ

6.1. Пакування засобу.

ПРАЙМДЕЗИМ випускають у пластикових флаконах по 25мл, пластикових флаконах по 1 л з дозуючим пристроєм, пластикових каністрах по 5л. За домовленістю із замовником асортимент пакування може бути змінений або доповнений.

6.2. Умови транспортування засобу.

Засіб транспортують усіма видами транспорту згідно з правилами перевезення вантажів відповідної категорії.

6.3. Термін та умови зберігання засобу.

Термін придатності засобу ПРАЙМДЕЗИМ – 3 роки з дати виготовлення. Зберігати в оригінальній упаковці за температури від +5 до +40 °С у недоступному для дітей місці. Забороняється використання засобу після закінчення терміну придатності.

Засіб дезінфікуючий «Санітаб»

І Н С Т Р У К Ц І Я

**із застосування дезінфекційного засобу "Санітаб" виробництва ТОВ «Інтердез»
з метою дезінфекції та достерилізаційного очищення**

2019

Засіб дезінфекційний «Санітаб» внесено до
Державного реєстру дезінфекційних засобів
05.06. 2019 р. за №154 на термін до
05.06.2024 р.



Затверджую
Директор ТОВ «Інтердез»
Таранович Н.А.

05.06.2019 / 2

ІНСТРУКЦІЯ

із застосування дезінфекційного засобу "Санітаб" виробництва ТОВ «Інтердез»
з метою дезінфекції та стерилізаційного очищення

1. ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

1.1. Повна назва засобу – дезінфекційний засіб "Санітаб".

1.2. Виробник – ТОВ "Інтердез" за ТУ У 24.2-37403360-002:2011 зі змінами №1 і №2.

1.3. Склад засобу, вміст діючих та допоміжних речовин, мас. %: натрієва сіль дихлорізоціанурової кислоти – 80,0-85,0% (активно діюча речовина, джерело активного хлору); допоміжні речовини: адипінова кислота (8-10%), суміш карбонату натрію та бікарбонату натрію або лише карбонат натрію (8-10%) (залежно від використаної сировини, але не впливає негативно на функціональні властивості засобу). Допоміжні речовини прискорюють диспергування і розчинення таблеток, регулюють рН розчину, встановлюючи його в оптимальному для антимікробної дії діапазоні, зменшують корозійну і фіксуючу дію розчинів.

До складу засобу може входити мийний компонент і ароматизатор. Наявність додаткових функціональних компонентів (зокрема, мийного) позначається на етикетці і в сертифікаті якості на засіб.

1.4. Форма випуску і фізико-хімічні властивості засобу. Засіб "Санітаб" виготовляється у вигляді швидко розчинних таблеток масою $3,2 \pm 0,2$ г. Вміст активного хлору в одній таблетці - не менше 1,5 г. Таблетки засобу білого кольору круглої форми, можуть мати на поверхні насічки, які дозволяють ділити таблетку при приготуванні робочих розчинів.

Засіб добре розчиняється у воді. Водні розчини прозорі, мають незначний запах хлору, не пошкоджують поверхні з деревини, скла, полімерних матеріалів, а також посуд, іграшки, виробів медичного призначення, предмети догляду хворих, виготовлені із корозійностійких металів, скла, гуми і пластмас; мають мийні властивості (видаляють механічні і нестійкі забруднення) без піноутворення, вибілюють тканини; не фіксують на поверхнях обробки органічні забруднення, добре змиваються з оброблених поверхонь, не залишаючи слідів і нальоту. Для посилення мийних властивостей розчинів засобу "Санітаб" можливе додавання до них мийних засобів (до 0,5%).

1.5. Призначення засобу.

У вигляді робочих розчинів засіб призначено для проведення профілактичної, поточної, заключної дезінфекції, генеральних прибирань:

1.5.1. в лікувально-профілактичних закладах будь-якого профілю, включаючи хірургічні, акушерсько-гінекологічні, неонатологічні, травматологічні, стоматологічні, урологічні і інші відділення хірургічного профілю; в соматичних, фізіотерапевтичних і реабілітаційних відділеннях; в клінічних, бактеріологічних, вірусологічних, паразитологічних, імунологічних лабораторіях; в протитуберкульозних, шкірно-венерологічних, мікологічних і інфекційних відділеннях, вогнищах інфекційних захворювань; у відділеннях переливання крові і донорських пунктах; в аптечних закладах (аптеки, аптечні пункти, аптечні кіоски, аптечні склади), поліклініках для дітей і дорослих, медсанчастинах і медпунктах, фельдшерсько-акушерських пунктах, в санітарних пропускниках; в патологоанатомічних відділеннях, моргах, відділеннях судмедекспертизи; в дитячих закладах;

- для дезінфекції виробів медичного призначення, включаючи стоматологічні інструменти із корозійностійких металів (в т.ч. з низьковуглецевої сталі, нікельованих металів), скла, пластмас, гуми на основі силіконового і натурального каучуку (за винятком ендоскопів); лабораторного посуду, перукарських, манікюрних і косметологічних інструментів і приладдя;

- для дезінфекції, в т.ч. поєднаної з достерилізаційним очищенням (ДСО), виробів медичного призначення, перукарських, манікюрних і косметологічних інструментів і приладдя;
- для попереднього промивання перед дезінфекцією і ДСО виробів медичного призначення, забруднених кров'ю та іншими біологічними рідинами;
- для дезінфекції поверхонь приміщень, твердих меблів, медичних апаратів та приладів, санітарно-технічного обладнання (ванни, душові, унітази, раковини), посуду столового, аптечного і лабораторного (в т.ч. одноразового використання, пробірки, шпатель, предметні і покривне скло, циліндри, кооби, чашки Петрі, пластини для імунологічних аналізів тощо), іграшок, білизни, предметів догляду хворих, прибирального інвентарю, луття з гуми, пластмас і інших полімерних матеріалів, гумових килимків;
- для дезінфекції слизовідсмоктуючих систем стоматологічних установок, пловальниць, зубних протезів і заготовок з пластмас, кераміки, металів;
- для дезінфекції пловальниць, звільнених від мокротиння, камер для збору мокротиння, дезінфекції виділень хворих і біологічних рідин всіх видів (фекалій, сечі, мокротиння, крові, сироватки, еритроцитарної маси) у т.ч. біологічних рідин, розлитих на поверхні, промиваних водою;
- для знешчарування медичних відходів, в т.ч. з текстильних матеріалів (включаючи відпрацьований перев'язувальний матеріал, ватяні кульки, тампони, медичний одяг і білизну одноразового використання, маски), виробів медичного призначення одноразового використання і біологічних рідин;
- для дезінфекції і вибілювання білизни та інших текстильних виробів;
- для знешчарування повітря і дезінфекції поверхонь у приміщеннях аерозольним методом при інфекційних захворюваннях, а також з профілактичною метою і для боротьби з пліснявою із застосуванням генераторів високодисперсних аерозолів (с дисперсністю ≥ 1 мкм);
- для облаштування санітарних бар'єрів (у т.ч. в дезінфікуючих килимках);
- для дезінфекції і дезодорування сміттєзбирального устаткування, неметалевих контейнерів для медичних відходів й сміттєбірників;
- для дезінфекції санітарного автотранспорту, транспорту для перевезення харчових продуктів і сировини, транспорту для перевезення побутових відходів і сміття та ін.;

Для проведення профілактичної дезінфекції та генеральних прибирань:

- 1.5.2. в санаторно-курортних закладах, в місцях масового відпочинку;
- 1.5.3. на підприємствах фармацевтичної, мікробіологічної, парфумерно-косметичної, харчопереробної промисловості;
- 1.5.4. в закладах ресторанного господарства (ресторани, фабрики-кухні, кафе та ін.) і торгівлі (для обробки поверхонь приміщень і технічного обладнання, столового і кухонного посуду й інвентарю та ін., для дезінфекції шкаралупи харчових яєць, знешчарування овочів та фруктів тощо);
- 1.5.5. в дитячих дошкільних і навчальних закладах усіх рівнів акредитації, спортивно-оздоровчих і спортивно-розважальних комплексах (в т.ч. в плавальних басейнах, аквапарках, включаючи душові, роздягальні, санітарні кімнати та ін. (в т.ч. для обробки санітарно-технічного обладнання, поверхонь приміщень, санвузлів, гардеробних, ванн, підомасажних ванн, басейнів, поверхонь з плитковим покриттям та ін.);
- 1.5.6. на об'єктах і в установах соціального забезпечення (будинки престарілих, інтернати, центри соціальної реабілітації тощо);
- 1.5.7. в аптечних закладах (в т.ч. аптечних кіосках і складах);
- 1.5.8. в закладах і на об'єктах комунально-побутового обслуговування і призначення (в т.ч. в садках, лазнях, громадських туалетах (в т.ч. для знешчарування накопичувальних баків автономних туалетів), душових, санпропускниках, перукарнях, салонах краси, пірсінгу і татування, манікюрних, педикюрних і косметологічних кабінетах, СПА-салонах, пральнях, хімічках тощо);
- 1.5.9. у громадських і адміністративних закладах і будівлях;
- 1.5.10. в місцях постійного і тимчасового проживання (готелі, хостели, гуртожитки, квартири тощо);
- 1.5.11. в підприємствах зв'язку і банківських установах;
- 1.5.12. на об'єктах прибирання клінічними компаніями;
- 1.5.13. на об'єктах і в підрозділах міністерства внутрішніх справ та оборони (в т.ч. в казармах), в установах пенітенціарної системи;
- 1.5.14. на об'єктах водопостачання і каналізування, підприємствах з транспортування, сортування

і переробки сміття;

1.5.15. в умовах надзвичайних ситуацій;

1.5.16. на рухомому складі і об'єктах забезпечення громадського пасажирського міського транспорту, залізничного (в т.ч. пасажирського і вантажного), водного, повітряного (паземні служби і об'єкти) транспорту;

Засіб призначено також:

1.5.17. для знезараження питної води і води в басейнах, дезінфекції смістою для зберігання і транспортування питної води, водопровідних споруд;

1.5.18. для знезараження стічних вод, каналізаційних стоків і систем їх відведення;

1.5.19. для дезінфекції водопровідних споруд і шахтних криниць;

1.5.20. для боротьби з пліснявою і попередження її появи;

1.5.21. для дезінфекції на епідемічно значимих об'єктах інших галузей виробництва та сфери послуг, діяльність яких вимагає проведення дезінфекційних робіт відповідно до чинних санітарно-гігієнічних та протиепідемічних норм і правил, нормативно-методичних документів, методичних настанов для харчопереробних галузей тощо.

1.6. Спектр антимікробної дії. Засіб "Санітаб" має широкий спектр дезінфекційної дії, виявляє бактеріцидні властивості проти широкого спектру Грам- та Грам+ бактерій (включаючи *Salmonella*, метицилінрезистентний стафілокок (MRSA), *Pseudomonas* (сильно пійна паличка), збудників дизентерії, сальмонельозу, паратифу, черевного тифу, холери, чуми, туляремії, спороутворюючі мікроорганізми роду *Bacillus* і ін., збудників внутрішньоклітинних інфекцій), туберкулоцидні*, віруліцидні (в т.ч. проти збудників гепатитів А, В, С, ВІВ/СНІД, герпесу, грипу всіх типів, паратифу, пташиного грипу, SARS (атипова пневмонія), аденовірусної, ентеровірусної (в т.ч. поліомієліт, Коксаки, ЕСНО), коронавірусної, респіраторно-синтиціальної, рівовірусної, рога вірусної, цитомегаловірусної інфекції тощо), фунгіцидні (проти патогенних грибів роду *Candida* і дерматофітів, а також ефективний у знищенні та попередженні появи плісняви, у т.ч. в споривій формі) властивості. (*Примітка: Туберкулоцидна дія засобу досліджена на тест-штамі *Mycobacterium terrae* ATCC 15755). Засіб ефективний також проти збудників паразитарних хвороб (шести і осцети найпростіших, яйця й личинки гельмінтів).

1.7. Токсичність та безпечність засобу. Засіб "Санітаб" за параметрами гострої токсичності згідно ГОСТ 12.1.007-76 належить до 3 класу помірно небезпечних речовин при введенні в шлунок та до 4 класу мало небезпечних речовин при нанесенні на шкіру та при парентеральному введенні, у формі таблеток в наслідуючих концентраціях пари відносяться до 4 класу малонебезпечних засобів.

В умовах інгаляційної дії у вигляді пари належить до 4 класу мало небезпечних речовин за ступенем леткості. Засіб не має шкірно-резорбтивної, мутагенної, тератогенної, гонадотоксичної, ембріотоксичної та канцерогенної дії, сенсибілізуючої, кумулятивної властивості виражені слабо.

Робочі розчини засобу в умовах одноразової аплікації не спричиняють місцево-подразнювальної дії на шкіру та слизові оболонки очей. При багаторазовому нанесенні спричиняють сухість і лущення шкіри. Робочі розчини в концентраціях від 0,01% до 0,1% (за активним хлором) у вигляді пари не викликають подразнення органів дихання.

2. ПРИГОТУВАННЯ РОБОЧИХ РОЗЧИНІВ

2.1. Методика та умови приготування робочих розчинів. Робочі розчини засобу "Санітаб" готують в промаркованих місткостях шляхом розчинення певної кількості таблеток у воді.

При використанні засобу для знезараження питної води і для приготування робочих розчинів для дезінфекції слід керуватись кількістю активного хлору в таблетках засобу.

Всі концентрації робочих розчинів засобу "Санітаб" вказані в цій інструкції в процентах (%) за активним хлором.

За необхідності, для посилення мийних властивостей розчинів, які були виготовлені з таблеток засобу "Санітаб", до розчинів додають до 0,5% мийного засобу типу «Лотос».

2.2. Розрахунок для приготування робочих розчинів. Для приготування робочого розчину певну кількість таблеток (шт.) розчиняють у воді відповідно до розрахунків за такою формулою:

$$X = \frac{B \times 100}{A}, \text{ де}$$

X – кількість води (мл), необхідна для отримання розчину з потрібним вмістом активного хлору;

B – вміст активного хлору в таблетці, г;

A – необхідна концентрація активного хлору в робочому розчині, %.

Приклад розрахунків для приготування робочих розчинів засобу із таблеток, що містять 1,5 г активного хлору, наведено у таблиці 1.

Таблиця 1. Приготування робочих розчинів засобу "Санітаб" з таблеток, що містять 1,5 г активного хлору

Концентрація робочого розчину, % (за активним хлором)	Кількість таблеток, шт	Кількість води, л
0,01	1	15
0,015	1	10
0,03	1	5
	2	10
0,06	2	5
	4	10
0,1	7	10
0,15	5	5
	10	10
0,2	7	5
	14	10
0,3	10	5
	20	10
1,0	33	5
	67	10
3,0	100	5
	200	10

2.3. Термін та умови зберігання робочих розчинів. Термін придатності робочих розчинів – 7 діб за умови зберігання у щільно закритих не прозорих місткостях, захищених від світла, у затемненому місці при кімнатній температурі (*Примітка. Термін вказано у відповідності до результатів проведених досліджень для розчинів різних концентрацій*). Для дезінфекції виробів медичного призначення і посуду методом занурення робочі розчини можуть бути використані багаторазово в межах терміну придатності при відсутності зміни початкового зовнішнього вигляду розчину (відсутність помутніння, осаду або забарвлення тощо) і при позитивних результатах хіміко-аналітичного визначення вмісту активного хлору в розчині.

3. СПОСОБИ ЗАСТОСУВАННЯ ЗАСОБУ

3.1. Об'єкти застосування. Розчини засобу "Санітаб" застосовують для дезінфекції виробів медичного призначення багаторазового та одноразового використання (перед утилізацією), а також інших інструментів, призначених для виконання лікувальних, діагностичних та косметологічних процедур, пов'язаних з пошкодженням шкіри та слизових оболонок (в т.ч. для дезінфекції, послідовної з стерилізаційним очищенням); предметів дослиду хворих із тих самих матеріалів (в т.ч. грінки, наконечники для спринцівок, підкладки клеюнок, судна тощо); білизни натільної та постільної, спеціального, медичного та захисного одягу, в т.ч. одноразового використання перед утилізацією; посуду столового, аптечного та лабораторного; предметів для миття посуду; іграшок; поверхонь приймачів (в т.ч. в місцях постійного або тимчасового проживання людей, на транспорті, в кухонних зонах переробки і приготування продуктів харчування та ін.), холодильного обладнання, твердих меблів, медичних апаратів, приладів, ємностей для зберігання питної води, шпательні харчових вощ; санітарно-технічного обладнання (в т.ч. ванни для бактеріологічних процедур, чашки басейнів, накопичувальні басейни і поверхні

відповідної інфекції. По закінченні часу дезінфекції виробляють утилізувати. Контейнери для збору медичних відходів знезаражують способом протирання або зрошення за режимом відповідної інфекції.

3.2.16. Дезінфекція об'єктів в плавальних басейнах. Щоденній дезінфекції в плавальних басейнах підлягають:

- в приміщеннях ванни басейну: ванна басейну, обідні доріжки, трапи, спортивні тумби, лавки, високі ванни;
- в роздягальнях, душових, санвузлах: підлога, стіни, двері, ручки дверей, шафи, лавки, гумові килимки, дерев'яні решітки, крани, санітарно-технічне обладнання;
- в місцях загального користування та підсобних приміщеннях: підлога, стіни, двері, ручки дверей, предмети укомплектації.

3.2.16.1. Поверхні в приміщенні чаші басейну, роздягальнях, душових, санвузлах, в місцях загального користування та підсобних приміщеннях протирють ганчір'ям, що змочене в розчині засобу або зрошують при нормі витрати розчину 100 мл/м².

3.2.16.2. Дезінфекція чаші басейну проводиться після зливу води та її механічного очищення і миття дозволеними для цього мийними засобами з наступним споліскуванням водою зі шлангу. Дезінфекція чаші басейну та піддонів ванн здійснюється методом протирання або зрошення при нормі витрати розчину 100 мл/м².

3.2.16.3. Санітарно-технічне обладнання чистять йоржом або щіткою, змоченими розчинними засобу. Гумові килимки і дерев'яні решітки знезаражують методом протирання або зрошення.

3.2.16.4. Прибиральний інвентар після використання замочують у розчині засобу. По закінченні дезінфекції його промивають водою і висушують.

3.2.16.5. Для боротьби з пліснявою використовується розчин засобу "Санітб" з концентрацією активного хлору 0,1%. Уражені поверхні попередньо механічно очищують від грибкового нальоту та протирють ганчір'ям, яке змочене розчином засобу. Діють розчином високопуга. Обробку повторюють щодня або при появі ознак плісняви. Для попередження появи плісняви використовують розчин засобу з концентрацією активного хлору 0,015%.

3.2.16.6. Режим дезінфекції об'єктів у басейнах наведено у таблиці нижче.

Об'єкти знезараження	Концентрація розчину, % за активним хлором	Час знезараження хв.	Спосіб знезараження
Поверхні ванни басейну і ван для віг	0,06 0,1	60 30	Протирання або зрошення
Поверхні приміщення чаші басейну, роздягальень, душових, санвузлів	0,06 0,1	60 30	Протирання або зрошення
Поверхні місць загального користування і підсобних приміщень	0,015 0,03 0,06	60 30 15	Протирання
Санітарно-технічне обладнання [*] :			
- раковини, пісуари, унітази	0,1	30	2-разове протирання або зрошення
- душові кабінки, піддони	0,1	60	
Гумові килимки, дерев'яні решітки	0,1	60	Протирання або зрошення
Шкіряне взуття, бавовні капці з полімерних матеріалів	0,1	60	Протирання або занурення
Прибиральний інвентар	0,2	120	Замочування

^{*} Знезараження може проводитися з додаванням 0,5% мийного засобу

3.2.17. Знезараження води в плавальних басейнах. Ванну басейну необхідно заповнювати питною водою, що відповідає вимогам ДСанПіН 2.2.4-171-10 «Гігієнічні вимоги до води питної, призначеної для споживання людиною».

Посуд лабораторний (пробірки, піпетки, предметні склянки), гумові груші, шланги тощо у мікробіологічних лабораторіях	0,1	120	Занурення
Білизня, не забруднена	0,015	60	Замочування
Білизня, забруднена виділеннями	0,15	120	Замочування
Іграшки	0,03	60	Занурення або протирання
Поверхні приміщень, медичних приладів, транспортних засобів, жорстких меблів тощо**	0,01	90	Протирання або зрошення
	0,015	60	
	0,03	30	
Санітарно-технічне обладнання**	0,06	15	Дворазове протирання або зрошення
	0,03	120	
	0,06	60	
0,1	30		
	0,2	120	Заливання: 2 об'єми розчину на 1 об'єм біологічних виділень
	0,06	90	Занурення
0,1	60		
Медичні відходи з текстильних матеріалів (перев'язувальний матеріал, тампони, маски, одноразова білизня тощо)	0,15	120	Занурення або замочування
0,3	45		
Вироби медичного призначення одноразового використання перед утилізацією, контейнери для збору медичних відходів і підстилкового матеріалу	0,06	60	Занурення або протирання
	0,1	30	
Прибиральний інвентар і матеріал	0,1	90	Замочування
	0,15	60	

* В тому числі для об'єктів, забруднених кров'ю;

** Для посилення мийної дії розчинів можливо додавання до них 0,5% мийного засобу.

Таблиця 3. Режим дезінфекції об'єктів розчином засобу "Санітаб" при інфекціях вірусної етіології (в т.ч. поліомієліт, рота-, ентеровірусні інфекції), а також інфекціях з парентеральним механізмом передачі, в т.ч. гепатит В і СНІД)

Об'єкти знезараження	Концентрація розчину, % (за активним хлором)	Час обробки, хв.	Спосіб обробки
Вироби медичного призначення із корозійностійких металів, скла, гуми, пластмас	0,06	60	Занурення
	0,1	30	
Предмети догляду хворих зі скла, пластмас, гуми, корозійностійких металів*	0,06	60	Занурення або протирання
	0,1	30	

6. ПАКУВАННЯ, ТРАНСПОРТУВАННЯ, ЗБЕРІГАННЯ

6.1. Пакування засобу. Залежно від вимог споживача засіб може упакуватися в різні види тари. В якості споживчої тари при поштучовому пакуванні використовують: пакети полімерні (з пакуванням (1 - 10) таблеток); контурну чарункову або безчарункову упаковку з полімерних матеріалів (з пакуванням (1 - 20) таблеток); туби полімерні (з пакуванням (10 - 20) таблеток). В якості споживчої тари при пакуванні насипом використовують банки полімерні (масою нетто засобу від 0,1 кг до 3,0 кг). За узгодженням з споживачем можливі інші об'єми та форми упакування.

6.2. Умови транспортування засобу. Транспортування засобу здійснюють автомобільним, залізничним, авіаційним або морським транспортом згідно з правилами перевезення відповідної категорії вантажів.

6.3. Термін та умови зберігання засобу. Засіб зберігають в щільно закритому пакуванні виробника, у прохолодних, темних, сухих приміщеннях, які не мають доступу для сторонніх осіб, окремо від продуктів харчування, лікарських засобів, сильних кислот, лугів, окисників. Засіб та його робочі розчини не займисті, вибухобезпечні.

Гарантійний термін зберігання засобу - 5 років від дати виробництва за умови дотримання правил зберігання.

Засіб миючий «ENDOQUICK»

Safety Data Sheet

EndoQuick



Section 1

Product Description

Product Name:	EndoQuick
Manufacturer:	Best Sanitizers, Inc. PO Box 1360 Penn Valley, CA 95948
Chemical Information Emergency: Chemtrec	1.800.424-9300

Section 2

Hazard Identification

Classification of the substance or mixture:

Skin Corrosion or Irritation.	Category 2
Serious Eye damage.	Category 1
Acute oral toxicity.	Category 5

Danger



Appearance—Aqueous solution
Physical state—Liquid
Odor— Odorless

Hazard Statements

Causes skin irritation.
 Causes serious eye damage.
 May be harmful if swallowed.

Precautionary Statements

If medical advice is needed, have product container or label at hand.
 Keep out of reach of children.
 Causes severe eye damage.
 Read label before use.
 Do not eat, drink or smoke when using this product.
 May be harmful if inhaled. Material is extremely destructive to the tissue of the mucous membranes and upper respiratory tract.
 Wash skin thoroughly after handling.
 Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
 IF SWALLOWED: Rinse mouth. Do NOT induce vomiting. Wash contaminated clothing before reuse.
 IF INHALED: Remove victim to fresh air and keep at rest in a position comfortable for breathing. Immediately call a POISON CENTER or doctor.
 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses if present and easy to do. Continue rinsing.
 Keep only in original container. Store locked up.
 Dispose of contents and container as instructed in Section 13.

Safety Data Sheet

Section 3

Composition/Information on Ingredients

Chemical Name	CAS No.	Weight-%
Potassium Hydroxide	1310-58-3	< 5
Sodium Xylene Sulphonate	1300-72-7	< 11
Purified water	7732-18-5	< 57

Section 4

First Aid Measures

First Aid Measures

Eye Contact	Hold eye(s) open and rinse slowly and gently with water for 15 minutes. Remove contact lenses, if present, after first 5 minutes, then continue rinsing eye(s). Seek medical advice/attention.
Skin Contact	Wash affected area with water. Rinse/flush exposed skin gently using water for at least 15 minutes. Remove contaminated clothing. Seek immediate medical attention.
Inhalation	Remove to fresh air. If not breathing, give artificial respiration. Seek immediate medical attention if discomfort or irritation persists.
Ingestion	Rinse mouth thoroughly. Do NOT induce vomiting. Never give anything by mouth to an unconscious person. Drink large quantities of water. Seek medical attention if irritation, discomfort or vomiting persists.

Most important symptoms and effects, both acute and delayed

Irritation/burns. Shortness of breath. May cause severe burns, blindness and/or permanent damage. May cause burns, deep penetrating ulcerations of the skin, delayed tissue destruction, redness, pain. May cause gastrointestinal irritation with nausea, vomiting and diarrhea.

Indication of any immediate medical attention and special treatment needed

If seeking medical attention, provide SDS document to physician.

Safety Data Sheet

Section 5

Fire-Fighting Measures

Suitable Extinguishing Media

Dry Chemical, Water spray (fog), Carbon dioxide (CO₂), Foam.

Unsuitable Extinguishing Media

No Information available.

Specific hazards arising from the chemical

Toxic and/or irritating fumes including carbon monoxide and carbon dioxide may be emitted.

Protective Equipment and Precautions for Firefighters

As in any fire, wear self-contained breathing apparatus pressure-demand, MSHA/NIOSH (approved or equivalent) and full protective gear. Water may be used to cool containers. Ensure that no spillage enters drains or watercourses. Remove from the vicinity containers not involved in the fire.

Section 6

Accidental Release Measures

Personal Precautions, Protective Equipment and Emergency Procedures

Personal Precautions

Use personal protection recommended in Section 8. Ensure adequate ventilation, especially in confined areas. Keep unprotected persons away. Keep away from ignition sources. Protect from heat. Stop the spill if possible. Contain spilled material by diking or using inert absorbent.

Environment Precautions

Environmental Precautions

Prevent entry into waterways, sewers, basements or confined areas. See Section 12 for additional ecological information.

Methods and material for containment and cleaning up

Methods for containment

Stop leak if safe to do so. Contain spill with liquid binding material, such as toweling or diatomaceous earth. Allow the inert material to absorb the spill, then place in an appropriate waste disposal container.

Methods for cleaning up

Always obey local regulations. Place into properly labeled containers for recovery or disposal. If necessary, use trained response staff/contractor. Collect spilled material in a covered container. Prevent spill from entering sewers or waterways. Collect and dispose of spilled material according to local, state and federal regulations. Wash away remnants with copious amounts of cold water.

Section 7

Handling and Storage

Precautions for Safe Handling

Advice on Safe Handling

Any non-intended or non-authorized use of this product may result in severe personal injury or damage to equipment. Follow good hygiene procedures when handling chemical materials. Do not eat, drink or smoke or use personal products when using this product. Do not handle with incompatibles. Avoid splashes.

Safety Data Sheet

Conditions for safe storage, including any incompatibilities

Storage Conditions

Keep Containers tightly closed in a dry, cool and well-ventilated place. Store product in original container. Wash hands and face thoroughly after handling and before breaks. Keep away from food stuffs. Store with like hazards. Protect from freezing. Store in a cool (0-30°C/32-86°F), dry, well ventilated area away from incompatible materials.

Section 8

Protection Information

Control Parameters:

1310-58-3 Potassium Hydroxide, OSHA PEL-2 mg/m³ Ceiling.
1310-58-3 Potassium Hydroxide, ACGIH TLV-2 mg/m³ Ceiling.

Appropriate Engineering Controls

Engineering Controls

Emergency eyewash fountains and safety showers should be available in the immediate vicinity of use/handling. Ensure adequate ventilation. Provide exhaust ventilation or other engineering controls to keep the airborne concentrations of airborne concentrations below the applicable workplace exposure limits.

Safety Data Sheet

Individual Protection Measures, such as personal protective equipment

Eye/Face protection	Wear safety glasses with side shields(or goggles).
Skin and body protection	Wear impermeable and resistant to the product/ substance/preparation protective gloves. Selection of glove material on considration of the penetration times, rates of diffusion and degradation.
Respiratory protection	Not required under normal conditions of use. If exposure limits are exceeded or irritation is experienced, NIOSH/MSHA approved respiratory protection should be worn. Positive-pressure supplied air respirators may be required for high airborne contaminant concentrations. Respiratory protection must be provided in accordance with current local regulations.
General Hygiene	The usual precautionary measures are to be adhered to when handling chemicals. Keep away from food, beverages and feed soures. Immediately remove al soiled and contaminated clothing. Wash face, hands and any exposed skin thoroughly after handling. Wash contaminated clothing and shoes before reuse. Do not Eat, Drink or Smoke when using this product. Do not inhale gases/fumes/dust/mist/vapors/aerosols. Avoid contact with the eyes and skin.

Section 9

Physical and Chemical Properties

Information on basic physical and chemical properties

Formula:	See Section 3	Physical State:	Liquid
Odor:	Odorless	Appearance:	Aqueous solution
Odor Threshold:	Not Determined	Color:	Colorless to faint yellow

<u>Property</u>	<u>Values</u>
pH	> 13.5
Meting Point/Freezing Point	0°C
Boiling Point/Boiling Range	100°C
Flash Point	Not Applicable.
Evaporation rate	Not Determined.
Flammability (solid, gas)	Not Applicable.
Flammability Limit in Air	
Upper flammability limit:	Not Applicable.
Lower flammability limit:	Not Applicable.
Vapor pressure:	Not Applicable.
Vapor density:	Not Applicable.
Specific Gravity	1.09
Solubility	Miscible in water.
Partition coefficient	No Determined.
Autoignition temperature	Not Determined.
Decomposition temperature	Not Determined.
Kinematic viscosity	No information available.
Dynamic viscosity	No information available.

Safety Data Sheet

Section 10

Stability and Reactivity Data

Reactivity	None.
Chemical Stability	Stability under normal ambient storage conditions.
Possibility of Hazardous Reactions	Not known.
Conditions to avoid	Avoid high temperatures during shipment and temporary, short-term storage. Protect against physical damage and freezing.
Incompatible materials	Store away from oxidizing agents, strong acids or bases, aluminum, tin, zinc, chlorinated hydrocarbons, acetone.
Hazardous Decomposition Products	Not known.

Section 11

Toxicity Data

Acute Toxicity:

Sensitization	No Information Available
Germcell mutagenicity	No Information Available
Carcinogenicity	No Information Available
Reproductive toxicity	No Information Available
STOT single exposure	No Information Available

Chronic:

Ingestion	None known.
Eyes	May cause permanent damage.
Skin	None known.
Inhalation	None known.

TOXICITY DATA

Potassium Hydroxide	LD50 365mg/kg (oral, rat)
Sodium Xylene Sulfonate	LD50 650mg/kg (oral, rat) , LD50 5939mg/kg (oral, mouse)

Safety Data Sheet

Section 12

Ecological Data

Ecotoxicity

No Information Available

Persistence and degradability

No Information Available

Bioaccumulation

Not Bioaccumulative.

Mobility in soil

No Information Available.

Other adverse effects

No additional information.

Section 13

Disposal Information

Waste treatment methods

Disposal of wastes

Disposal should be in accordance with applicable regional, national and local laws and regulations. Do not dispose together with household garbage. Do not allow product to reach sewage system or open water.

Section 14

Transport Information

DOT

UN Number 1719

Class 8 Caustic Alkali Liquid

Packing Group III

May be transported as Limited Quantity.

Section 15

Regulatory Information

International Inventories

TSCA

Complies

DSL/NDSL

Complies

Legend:

TSCA—United States Toxic Substances Control Act Section 8(b) Inventory

DSL/NDSL—Canadian Domestic Substances List/Non-Domestic Substances List

US Federal Regulations

SARA 313

Section 313 of Title III of the Superfund Amendments and Reauthorization of 1986 (SARA).

None of the ingredients is listed.

SARA 311/312

Potassium Hydroxide: immediate health hazard.

Safety Data Sheet

US State Regulations

California Proposition 65

None of the ingredients are listed.

Section 16 Additional Information

<u>NFPA</u>	Health Hazards	Flammability	Instability	Physical and Chemical Properties
	3	0	1	0
<u>HMIS</u>	Health Hazards	Flammability	Physical Hazards	Personal protection
	3	0	1	X

Prepared by: Technical Department
Revision Date: January, 2018
Version: 2
Revision Note: No information available

Disclaimer

The information provided in this Safety Data Sheet is correct to the best of our knowledge, information and belief at the date of its publication. The information given is designed only as guidance for safe handling, use, processing, storage, transportation, disposal and release and is not to be considered a warranty or quality specification. The information relates only to the specific material designated and may not be valid for such material used in combination with any other materials or in any process, unless specified in the text.

End of Safety Data Sheet

LS 104-175-00.004

bacteria. Since some species of this bacteria are pathogenic, studies have focused on producing it from bacterial strains generally recognized as safe (GRAS), such as *Streptococcus thermophilus* (3). The biosynthesis of hyaluronic acid in *S. thermophilus* requires much energy, and bacteria cells compete for the carbon source they use for cell growth. When a small amount of the carbon source is available, the most significant percentage of the carbon source is quickly consumed for growth, which leads to a decrease in acid productivity with a high rate of its molecular weight. However, when bacteria grow in the presence of an abundant amount of carbon source, hyaluronic acid production is observed at a high rate (4). In addition, there is a close relationship between the type of carbon source, the amount of acid produced, and the amount of biomass, as lactose is the preferred carbon source for *S. thermophilus* in the metabolism process. Thus, it produces a more significant amount of polysaccharides, including hyaluronic acid (1, 5). The amount of acid produced is affected by the difference in the nitrogen source and its percentage in the production medium (6).

Previous studies indicated that the amount of acid produced is affected by production conditions such as incubation temperature, inoculum size, pH, incubation period, and incubator vibration speed (7-9). Therefore, the present study was designed to find the best conditions for producing hyaluronic acid from *S. thermophilus* to reduce production costs.

2. Materials and Methods

2.1. Isolation of Bacteria

A series of decadal dilutions of yogurt samples taken from Basrah local markets in 0.1% peptone solution was carried out, and 1 ml of the last three dilutions was taken and spread by L-shape glass diffuser on the surface of M17 agar medium in Petri dishes. The plates were incubated at 42° C for 48 h under aerobic conditions (10).

2.2. Phenotypic Identification of Isolates

2.2.1. DNA Extraction

The Kit Presto™ Mini gDNA Bacteria Extraction Kit supplied by Geneaid Biotech Ltd was used to extract

DNA from bacterial isolates. The process of DNA extraction and PCR amplification was carried out according to the manufacturer's instructions.

2.2.2. Primers and PCR Conditions

The following primer, and 0.5 U Taq DNA polymerase (BOIRON), and 500 ng DNA. The reaction comprised of an initial denaturation for 2 min at 95°C; 35 cycles of denaturation for 1 min at 95°C, annealing for 1 min at 56°C, and elongation for 1 min at 72°C; and final polymerization for 10 min at 72°C; the amplicons were stored at 4°C.

2.3. Culture Media and Fermentations

Three culture media were used to produce MRS broth, Skim milk, and M17 broth, adding 1% lactose (11). The diagnosed bacterial strains were grown in 100 ml of culture media, placed in volumetric flasks of 250 ml capacity, and incubated at 42°C for 24 hours, pH 6.8, inoculum volume 1%, and a vibrating incubator at 150 rpm (12). Biomass was estimated according Izawa, Serata (13).

2.4. Extraction and Purification of Hyaluronic Acid

After the end of the fermentation period, the isolation and purification of HA were performed by the procedure described previously (14). Briefly, proteins were removed using 1% trichloroacetic acid (TCA), and HA in the supernatant was collected by isopropanol precipitation. The collected HA was dialyzed against ultrapure water and lyophilized. The amount of acid produced was estimated according to the method Sciabica, Tafuro (15).

2.5. Optimal Conditions for HA Production

2.5.1. Carbon and Nitrogen Sources for Hyaluronic Acid Production

Several carbon sources were used to replace it with lactose in the medium of optimal production. The prepared alternatives included date juice according to what was mentioned in Al-Roomi and Al-Sahlany (16), grape juice (17, 18), and whey (19). The total lactose of these substitutes was estimated by the Lane-Eynon method mentioned in Ranganna (20). Lactose constitutes 20 g/L in the medium of optimal production, with equivalents consisting of date juice,

2.2. Organisms and culture conditions

Five local *Streptococcus thermophilus* isolates used in this study were obtained from the Dairy Technology Lab, Agriculture College, University of Basrah. It was grown in M17 agar medium for 48 h at 42 °C [26,27].

2.3. HA production and fermentation conditions

S. thermophilus produces HA in fermentation broth using the method described by [28], with some changes made to the production steps to improve HA production. Each strain of *S. thermophilus* was cultivated in M17 agar medium for a brief period of time. The cultivated cells were transferred to M17 broth medium at 42 °C and 150 rpm for 24 h. The amount crude HA in the fermentation broth was calculated by the carbazole method [29], with some modifications in its purification steps were enhance the yield of HA and its purity as described in the literature [30–33]. The fermentation broth was first precipitated with three volumes of ethanol, followed by centrifugation at 7000 rpm for 30 min. To remove the solid mass and reduce viscosity, The precipitate was collected by centrifugation re-dissolved in NaCl 0.15 M and centrifuged for 5 min at 3000 rpm. The precipitate was recovered and re-dissolved in deionized water, By decreasing the pH of the broth to 2 with 1% trichloroacetic acid, then treating it with charcoal (1–2%) for 1 h at 4 °C, followed by centrifugation at 7000 rpm for 30 min, the nucleic acids and bacteria-derived proteins in crude samples were eliminated. After removal of cells and charcoal, the solution was readjusted to a pH of about 6 with NaOH 0.1% and diluted with the equal volume deionized water. HA solution was passed through Millipore filters 0.45 µm. Then, the amount crude

HA was determined.

2.7. Determination of the antioxidant activity of HA

2.7.1. DPPH radicals scavenging activity assay

A free radical of 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) was utilized to assess free radical scavenging, according to the method given by [34,35] with minor modifications. In 0.2 mL of ethanol, DPPH was dissolved at a concentration of 0.04 µg/ mL. (50, 100, 300, 500, 700, 1100, and 1300 g/mL) of distilled water were utilized to dissolve the HA sample. Each sample received 2.0 mL DPPH and was shaken immediately before being maintained at room temperature in the dark for 30 min. The absorbance of the supernatant was measured at 517 nm against a blank after centrifugation at 4500 rpm for 15 min (ethanol as an alternative of the sample and DPPH solution). Increased free-radical scavenging activity is indicated by a lower absorbance of the reaction mixture. The scavenging % was estimated by the use of the equation below: **scavenging %age activity (%) = [1 - (A₁ - A₂) / A₁]**, where A₀ is the sample's absorbance, A₁ is the sample's absorbance, and A₂ is the sample's absorbance under the identical conditions as A₁ but with water alternatively of DPPH* solution. At all doses examined, the HA's DPPH radical scavenging activity was observable, however it was lower than that of Butylated hydroxytoluene (BHT).

2.7.2. Reducing power scavenging activity assay

The reducing power of HA was calculated using [36], approach, including some modifications. 2 mL phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) and 2 mL 0.1% K₃Fe (CN) were added to each sample (50, 100, 300, 500, 700, 1100, and 1300 µg/ mL). After 30 min of incubation at 50°C, 1.5 mL of trichloroacetic acid solution (TCA, 10% w/ v) has been added to the mix. The supernatant (2 mL) was com-

Design, Synthesis, Characterization, and In Vitro Evaluation of a New Cross-Linked Hyaluronic Acid for Pharmaceutical and Cosmetic Applications

Sabrina Sciabica¹, Giovanni Tafuro², Alessandra Semenzato², Daniela Traini³, Dina M. Silva³, Larissa Gomes Dos Reis³, Luisa Canilli⁴, Massimo Terno⁴, Elisa Durini¹, Silvia Vertuani^{1,*}, Anna Baldisserotto^{1,*} and Stefano Manfredini¹

¹ Department of Life Sciences and Biotechnology, University of Ferrara, Via L. Borsari 46, 44121 Ferrara, Italy; scbsrn@unife.it (S.S.); dre@unife.it (E.D.); smanfred@unife.it (S.M.)

² Department of Pharmaceutical and Pharmacological Sciences, University of Padova, Via Marzolo 5, 35131 Padova, Italy; tafuro.giovanni.mds@gmail.com (G.T.); alessandra.semenzato@unipd.it (A.S.)

³ Macquarie Medical School, Department of Medical Sciences, Faculty of Medicine, Health and Human Sciences, Macquarie University & Woolcock Institute of Medical Research, Sydney 2037, Australia; daniela.traini@mq.edu.au (D.T.); dina.silva@sydney.edu.au (D.M.S.); larissagomesreis@yahoo.com.br (L.G.D.R.)

⁴ Istituto Ganassini S.p.A., Via Carlo Boncompagni, 63, 20139 Milano, Italy; l.canilli@ganassini.it (L.C.); dir.tecnica@ganassini.it (M.T.)

* Correspondence: vrs@unife.it (S.V.); bldnna@unife.it (A.B.); Tel.: +39-0532-455294 (S.V.); +39-0532-455258 (A.B.)



Citation: Sciabica, S.; Tafuro, G.; Semenzato, A.; Traini, D.; Silva, D.M.; Reis, L.G.D.; Canilli, L.; Terno, M.; Durini, E.; Vertuani, S.; et al. Design, Synthesis, Characterization, and In Vitro Evaluation of a New Cross-Linked Hyaluronic Acid for Pharmaceutical and Cosmetic Applications. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1672. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101672>

Academic Editor: Katarina Valachová

Received: 8 September 2021

Accepted: 11 October 2021

Abstract: Hyaluronic acid (HA), an excellent biomaterial with unique bio properties, is currently one of the most interesting polymers for many biomedical and cosmetic applications. However, several of its potential benefits are limited as it is rapidly degraded by hyaluronidase enzymes. To improve the half-life and consequently increase performance, native HA has been modified through cross-linking reactions with a natural and biocompatible amino acid, Ornithine, to overcome the potential toxicity commonly associated with traditional linkers. 2-chloro-dimethoxy-1,3,5-triazine/4-methylmorpholine (CDMT/NMM) was used as an activating agent. The new product (HA-Orn) was extensively characterized to confirm the chemical modification, and rheological analysis showed a gel-like profile. In vitro degradation experiments showed an improved resistance profile against enzymatic digestions. Furthermore, in vitro cytotoxicity studies were performed on lung cell lines (Calu-3 and H441), which showed no cytotoxicity.

Keywords: hyaluronic acid; cross-linking; biocompatibility

a crosslinker and a possible carrier of active moieties through its homo-bifunctional amino residues. Due to the safety and beneficial effects of ornithine and HA, these two components were chosen for the synthesis of a new and innovative HA-based biopolymer with enhanced bioactivity, mechanical properties, and reduced toxicity. The availability of these innovative raw materials prompted us to investigate potential cosmetic, pharmaceutical, and nutraceutical applications, not only of the molecule as is, as active ingredients, but also as possible carriers of active molecules to the skin, as previously described [37,38].

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Sodium salt Hyaluronate (HA) isolated from *Streptococcus equi* with average Mw 1.2 MDa was purchased from Caldic (Origgio, Varese, Italy). Ornithine methyl ester (H-Orn-OMe·2HCl) was purchased from Bachem. 4-methylmorpholine (NMM), NaCl, 0.025 M sodium tetraborate, sulfuric acid, and acetonitrile were purchased from Sigma-Aldrich. 2-chloro-dimethoxy-1,3,5-triazine (CDMT) purchased from TCI. The phosphate buffer saline (PBS) was purchased from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich SRL, Milano, Italy).

2.2. Cross-Linked HA-Orn

2.2.1. Processing Parameters

The synthesis of the product was conducted initially with EDC/NHS and then with CDMT/NMM as condensing agents to set up the ideal synthetic conditions to obtain an HA with a high degree of cross-linking and good yield. For the EDC/NHS route, several increasing stoichiometric ratios were used between HA: EDC: Ornithine but with poor results. From the scale-up study conducted, CDMT, in association with NMM, was found to be the most potent activator. Therefore, we switched to the latter as a condensing agent, leading to the synthesis of Ornithine cross-linked polymer, initially using an excess of both condensing agent and amino acid with a stoichiometric ratio of 1:4.5:3 between HA:CDMT/NMM:Ornithine. This ratio was subsequently reduced to 1:3:1.5 as it was able to offer the same product in terms of crosslinking and yield,

2.4.2. In Vitro Degradation

A stock solution of hyaluronidase from bovine testes (type IV-S powder, 1045 units/mg, lot SLCC9109, from Sigma Aldrich) was prepared at a concentration of 50 units/mL in PBS. The discs of each sample in this enzymatic solution were kept under agitation at 37 °C for different test times (up to 24 h) to verify the glucuronic acid released. To verify the absence of degradation phenomena due to temperature, a control was carried out on each test sample without Hase at the same temperature (data not shown).

2.4.3. Carbazole Assay

At pre-determined time points, 200 µL of supernatant was withdrawn and added to 3 mL of 0.025 M sodium tetraborate in tubes containing sulfuric acid. The samples were vortexed for 10 s and then boiled for 10 min at 100 °C. After cooling, 100 µL of 0.0125% carbazole reagent in EtOH (absolute) was added to the samples, and the reaction was started by boiling for further 15 min. The amount of GlcA produced after degradation was monitored by absorbance reading with a spectrophotometer UV-31 SCAN ONDA (Giorgio Bormac S.r.l., Carpi (Modena), Italy) at 523 nm. A blank control was prepared with phosphate buffer only.

2.5. Biological Assays

2.5.1. Cells Culture

Calu-3 and NCI-H441 cell lines (carcinoma-derived epithelia, ACTT, Rockville, MD, USA) were chosen as a model of respiratory cells due to their ability to grow in an air-liquid interface and produce tight junctions and mucus, similar to the physiological conditions observed in the lung. Both cell lines were cultured in 75 cm² flasks and were maintained in humidified 95% air, 5% CO₂ atmosphere, at 37 °C. Calu-3 was cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F-12 supplemented with 1% (v/v) non-essential amino acids, 1% (v/v) 200 mM L-glutamine solution, and 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), while H441 cells were cultured in RPMI-1640 medium, supplemented with 10% (v/v) FBS. Media were changed 2–3 times per week until confluency; then cells were passaged using trypsin at 1:3 and 1:7 ratios for Calu-3 and H441 cells, respectively. To establish an air-liquid interface (ALI), both cell lines were seeded at 3×10^4 cells per well of a Transwell polyester insert containing 100 µL in the apical chamber and 600 µL in the basal chamber. The medium from the apical chamber was removed 24 h after seeding and every day afterwards until an ALI was achieved, while the medium from the basal chamber was replaced every second day up to 14 days of culture. For H441, a differentiation medium was used on the basal chamber from day 2 from seeding the cells consisting of RPMI-1640 medium supplemented with 200 nM dexamethasone (Sigma) and 1% (v/v) insulin-transferrin-selenium supplement (100×, Gibco, Sidney, Australia).

2.5.2. MTS Assay for Cytotoxicity

Cells were seeded at a density of 50×10^4 cells/well in a 96-well plate. After 24 h, the media were removed and replaced with 100 µL of the raw materials prepared in HBSS. After 24 h incubation, 20 µL of MTS reagent was added to the wells and read after 3 h at 490 nm. The solutions were prepared as a serial dilution in the range of 0.009–0.30% (w/v) for HA and HA-Orn. DMSO 20% was used as the control for cell death.

Introduction

Lactose is a disaccharide form of sugar made up of one glucose and one galactose monosaccharide. In animals, millimolar levels of lactose are found in breast milk. In order for lactose to be absorbed into the bloodstream, lactase (secreted from the small intestines) cleaves lactose into glucose and galactose monosaccharides.

The inability to digest lactose is known as lactose intolerance, which arises from a reduction or loss in production of lactase, and is now more commonly known as "lactase deficiency". In most mammals, lactase deficiency is a normal condition that occurs shortly after weaning from breast milk as the primary food source. In humans, a significant population remains tolerant to lactose into adulthood due to the continued production of lactase in the small intestines. Some estimates suggest that 75% of the world's adult population is lactase deficient. Since the severity of lactose maldigestion symptoms can depend on the amount of lactose consumed, it is important to quantify the relative amounts of lactose in various dairy food sources.

Cell Biolabs' Lactose Assay Kit is a simple fluorometric assay that measures the amount of total lactose present in milk-based food products or biological samples (such as blood or urine from lactating animals) in a 96-well microtiter plate format. Each kit provides sufficient reagents to perform up to 100 assays, including blanks, lactose standards, endogenous controls*, and unknown samples. Sample lactose concentrations are determined by comparison with a known lactose standard. The kit has a detection sensitivity limit of 10 μ M lactose.

Assay Principle

Cell Biolabs' Lactose Assay Kit measures total lactose within food or biological samples. First, lactase cleaves lactose into glucose and galactose. Glucose is oxidized by glucose oxidase into D-gluconic acid plus hydrogen peroxide. The hydrogen peroxide is then detected with a highly specific fluorometric probe. Horseradish peroxidase catalyzes the reaction between the probe and hydrogen peroxide, which bind in a 1:1 ratio. Samples are compared to a known concentration of lactose standard within the 96-well microtiter plate format. Samples and standards are incubated for 45 minutes and then read with a standard 96-well fluorometric plate reader (Figure 1).

Note: Endogenous levels of glucose can interfere with the assay. Therefore, an endogenous control must be run for each sample to account for potential interference of these molecules.

