МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет)Біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»		**«До захисту допущено»**	
Директор інституту (декан факультету)		Завідувач кафедри	
_____	Грегірчак Н.М.	_____	Пирог Т.П.
(підпис)	(прізвище та ініціали)	(підпис)	(прізвище та ініціали)
«___» червень 2021 р.		«___» червень 2021р.	

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

з напряму підготовки (спеціальності) 162 «Біотехнології та біоінженерія»

на тему: Біосинтез гіалуронової кислоти *Streptococcus zooepidemicus*

Виконав: здобувач 4 курсу, групи 2
Бабич Маргарита Юріївна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

Керівник	Проф.Стабніков Віктор Петрович (прізвище, ім'я, по батькові повністю)	_____ (підпис)
Консультанти	Клименко О.М. (прізвище та ініціали)	_____ (підпис)
	_____ (прізвище та ініціали)	_____ (підпис)
	_____ (прізвище та ініціали)	_____ (підпис)
Рецензент	_____ (прізвище та ініціали)	_____ (підпис)

Засвідчую, що в цій дипломній роботі немає запозичень із праць інших авторів без відповідних посилань.
Здобувач _____
(підпис)

Київ - 2021р.

РЕФЕРАТ

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

Гіалуронова кислота - це природний полімер, присутній у всьому тілі, що має високі зволожуючи і ремоделюючи властивості. У найбільшої концентрації міститься в рідинах ока і суглобах.

Гіалуронова кислота виділяється із хрящьових тканин тварин або синтезується біотехнологічним способом за участі мікроорганізмів.

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

Технологічний процес складається з допоміжних стадій (приготування миючих засобів: Еклін-Н, хлорантоїн, дезекон; підготовки аераційного повітря; приготування та стерилізація титрувальних розчинів; приготування та стерилізація поживного середовища), основних робіт (вирощування інокуляту в колбах на качалках, в інокуляторі об'ємом 6 та 60 л, в посівному апараті об'ємом 0,63 $м^3$ та виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 6,3 $м^3$). У фіналі технолгічний процес закінчується післяферментаційними роботами: попередня обробка капсул клітин, відділення біомаси, ультрафільтрація, адсорбція активованим вугіллям, повторна ультрафільтрація, сушіння, фасування, пакування, маркування та відвантаження.

Кваліфікаційна робота містить 130 сторінок друкованого тексту, 18 таблиць, 14 рисунків і складається з вступу, десяти розділів, списку використаної літератури (58 джерел) та графічної частини (два креслення формату А1, три креслення формату А3 та одне креслення формату А2).

Ключові слова: гіалуронова кислота, біосинтез, натрій гіалуронат, культивування.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ 2

ВСТУП 5

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ГІАЛУРОНОВОЇ КИСЛОТИ 8

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА 13

2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування. 13

2.2. Рохрахунок складу поживного середовища 20

2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента 22

2.4. Таксономіний статус біологічного агента 22

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ 23

3.1. Потреба у гіалуроновій кислоті. 23

3.2. Розрахунок потужності виробництва. 24

3.3. Розрахунок об’єму ферментера та кількості виробничих циклів. 26

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу. 28

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ГІАЛУРОНОВОЇ КИСЛОТИ 31

4.1. Шляхи катаболізму сахарози у бактерій 31

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт 33

РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ 36

5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу. 36

5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера 32

5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря 39

5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів 40

5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища..... 44

5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту. 47

5.3. Підбір технологічного обладнання для післяферментаційних стадій з урахуванням матеріальних потоків по стадіях ……..56

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ..... 62

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ..... 67

РОЗДІЛ 8 КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА 84

8.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів 84

8.2. Мікробіологічний контроль..... 91

8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту..... 93

8.3.1. Концентрація біомаси..... 93

8.3.2. Концентрація гіалуронової кислоти 94

8.3.3. Визначення концентрації джерела вуглецю та азоту 94

8.4. Показники якості готового продукту 96

РОЗДІЛ 9 АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ УЛЬТРАФІЛЬТРАЦІЇ……101

РОЗДІЛ 10 ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ 105

10.1. Аналіз технологічної схеми виробництва гіалуронової кислоти на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів 96

10.2.Перспективи впровадження системи екологізації виробництва..... 105

10.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів 107

10.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів 108

10.2.3. Система знешкодження та утилізації газоповітряних викидів 109

ЛІТЕРАТУРА 110

ВСТУП

Гіалуронова кислота (ГК) є рівномірно повторювальним, лінійним глікозаміногліканом, що складається з 2000-25000 дисахаридів глюкуронової кислоти та N-ацетилглюкозаміну пов'язані по черзі β - (1-3) - і β - (1-4) – глікозидними зв’язками [1].

Завдяки в'язкопружній властивості в поєднанні з відсутністю токсичності кислоти, це призвело до широкого діапазону застосування у косметичній практиці, як зволожувач шкіри, фармацевтичному виробництві, створюючи препарати на основі гіалуронової кислоти, для лікування остеоартриту, застосування в офтальмологічній хірургії, профілактика спайок після операцій на черевній порожнині та загоєння ран.

Молекулярна маса ГК варіюється в широких межах в залежності від джерела виділення. Гіалуронова кислота, отримана з природних об'єктів, має молекулярну масу від 5 000 до 20 000 000 Да. Гіалуронова кислота може мати природне і біосинтетичні походження. Перевагами природного методу отримання гіалуронової кислоти є доступність і недорога вартість, але в той же час дані продукти мають низьку якість і ефективність, здатні викликати алергічні прояви. Гіалуронова кислота, одержана шляхом культивування бактерій, призводить до отримання ефективної продукції з високим ступенем очищення [1].

Хвороби кістково-м'язової системи, об'єднані в XIII класі МКБ, розглядаються в усьому світі як одна з найбільш поширених патологій сучасного суспільства. Серед них остеоартроз (ОА) - найбільш поширена патологія синовіальних суглобів [2].

Пріоритетним методом лікування остеоартрозу вважається використання «замісних» внутрішньосуглобових ін'єкцій гіалуронової кислоти. У світовій практиці використовують протези суглобової рідини, що містять гіалуронову кислоту різної молекулярної маси, структури і концентрації [3].

На сьогоднішній день на українському фармацевтичному ринку немає власного виробництва препарату, який би задовольняв потреби споживача при лікуванні остеоартрозу. Тому пропонується отримувати гіалуронову кислоту для подальшого створення препарату «Гіалган» (Fidia Pharmaceutici S.P.A.,Італія).

Препарат «Гіалган» – 1 %-й розчин гіалуронової кислоти, отриманої мікробіологічним шляхом із *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920, має ряд переваг, в порівнянні з промисловим, оскільки біотехнологічний процес є більш дешевим способом, а вихід цільового продукту – є більший та з високим ступенем чистоти продукту.

Середня ціна препарату – 677 гривень, що є доступною для більшості споживачів, серед інших препаратів, які мають надто високу ціну. Тому така ціна уможливлює більший попит на даний препарат [4].

Остеоартроз (ОА) - захворювання, що є найбільш частою причиною хронічного болю і порушення функції суглобів, тому завдання проведення максимально ефективної і безпечної знеболювальної терапії при ОА вельми *актуально.*

Препарати групи НПВЗ знімають тільки симптоми ОА, при цьому їх можна використовувати тільки коротким курсом, оскільки ця група препаратів негативно впливає на організм людини, має ряд побічних ефектів, а також є ризик до утворення подразнень верхніх оболонок ШКТ.

Тому в лікуванні ОА доцільно використовувати повільно-діючі симптом-модифікуючі препарати (хондропротектори), що дозволяють зменшити потребу в нестероїдних протизапальних засобів.

Гіалуронова кислота сприяє відновленню в'язко-еластичних властивостей синовіальної рідини, надає хондропротекторну, протизапальну та знеболювальну дії [5].

Новизною проекту є використання штаму *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920, який у порівнянні з іншими продуцентами гіалуронової кислоти, має простіший склад та бюджетну ціну поживного середвища, при цьому штам здатен продукувати вищу концентрацію гіалуронової кислоти. Біотехнологічний

спосіб дозволяє отримувати продукт зі стандартними заданими властивостями, який матиме високий ступінь очищення, низьку алергенність, а також вважається етичним по відношенню до природи, оскільки раньше ГК отримували із хрящових тканин тварин [6].

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Гіалуронова кислота являє собою складну полісахариду молекулу (полімер), що складається із залишків D-глюкуронової кислоти і D-N-ацетилглюкозамін, з'єднаних дисахаридними ланками. Даний полісахарид входить до складу міжклітинної речовини і заповнює простір серед колагенових і еластинових молекул, таким чином підтримуючи їх у робочому положенні. Гіалуронова кислота є головним компонентом синовіальної рідини, що відповідає за її в'язкість.

Молекулярна маса ГК варіюється в широких межах в залежності від джерела виділення. Гіалуронова кислота, отримана з природних об'єктів, має молекулярну масу (ММ) від 5 000 до 20 000 000. Середня ММ макромолекул ГК, що містяться в синовіальній рідині людини, становить 3 140 000 [1].

Розчини ГК мають унікальні реологічні властивості, які дозволяють цьому полімеру поводитися подібно в'язкопружні гелю навіть при низьких концентраціях. Методом кореляційної фотонної спектроскопії було показано, що в розчині макромолекула веде себе як згорнутий, досить щільно упакований ланцюг з радіусом вигину порядку 200 нм. Мала рухливість ланцюгів ГК зумовлена наявністю водневих зв'язків [1].

Молекула ГК є енергетично стабільною, завдяки стереохімії складових її дисахаридів. Об'ємні замісники піранозного кільця знаходяться в стерично-вигідних положеннях, в той час як менші за розміром атоми водню займають менш вигідні аксіальні позиції [7].

У молекулі гіалуронової кислоти D-глюкуронової кислоти пов'язана з аміноцукром за допомогою β- (1 → 3) -глікозидними зв'язку, а аміноцукор

пов'язаний з D-глюкуроновою кислотою за допомогою β- (1 → 4) - глікозидними зв'язками [7].

Наявність полярних і неполярних сегментів в структурі полімеру дає гіалуронової кислоти здатність хімічно взаємодіяти з різними хімічними агентами, наприклад, з метахроматичними барвниками, які знаходять застосування в клінічних дослідженнях, і хітозаном, що робить його можливе отримання нового класу матеріалів на основі поліелектролітних комплексів.

Гіалуронова кислота утворює водневі зв'язки, які, з одного боку, можуть врівноважувати макромолекулу в розчинах, але, з іншого боку, підвищувати жорсткість полімерної системи, що, в кінцевому підсумку, визначає властивості розчинів гіалуронової кислоти. *Рис. 1.1.* демонструє потенційні водневі зв'язку, які могли утворюватися як всередині однієї макромолекули, так і між приєднаними молекулами. Зверніть увагу, що водна молекула може бути мостом між двома з'єднаними функціональними групами. В кінцевому підсумку така первинна структура і водневі зв'язки допомагають формувати вторинні і третинні структури гіалуронової кислоти.

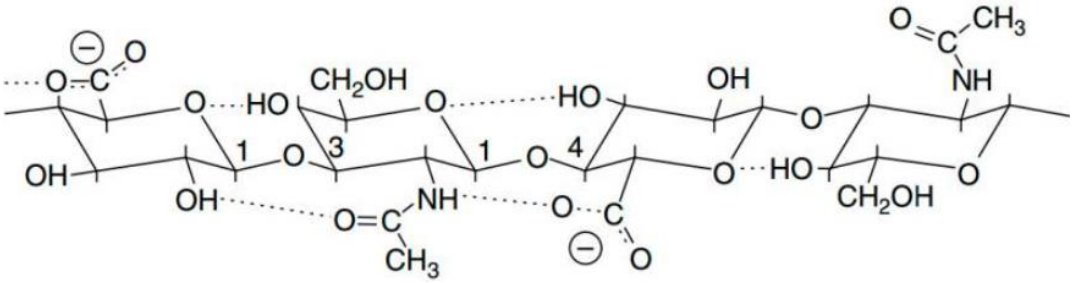


Рис.1.1 «Схематичне зображення утворення водневого зв'язку» [7]

Гіалуронова кислота і її сіль з іонами амонію, магнієм і лужними металами мають гарну розчинність у воді і мають високий рівень в'язкості навіть при низьких концентраціях полімеру. Більш того, гіалуронова кислота в розчині може організувати тривимірну клітинну структуру величезних розмірів при концентраціях менше 1 мкг / мл.

Гідродинамічний обсяг гіалуронової кислоти зазвичай аналізується при іонної силі, яка дорівнює фізіологічному рівню. Якщо розчин полімеру має зміст хлориду натрію приблизно менше 0,15 М, електростатичне відштовхування

збільшує гідродинамічний обсяг кожної макромолекули гіалуронової кислоти і збільшує відштовхування між ними.

Гідродинамічний розмір гіалуронової кислоти залежить від молекулярної маси.

Структура гіалуронової кислоти в розчині дуже чутлива до pH; додавання кислот або лугів призводить до зміщення балансу між силами відштовхування і тяжіння полімерних ланцюгів. При pH більше 11,0 і менше 4,0 гіалуронова кислота деполімеризується. Однак в лужних розчинах ефект розкладання сильно виражений через розрив водневих зв'язків, які відіграють важливу роль у структурній організації гіалуронової кислоти.

В'язкість розчинів гіалуронової кислоти унікальна і зберігає свою актуальність і значення в фізіологічних і біохімічних процесах, а також при розробці терапевтичних, медичних, клітинних, біоінженерних, косметичних і харчових застосувань гіалуронової кислоти.

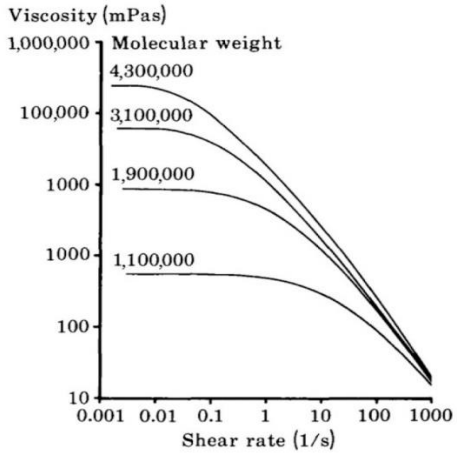


Рис.1.2. «Вплив молекулярної маси гіалуронової кислоти на динамічну в'язкість в залежності від швидкості зсуву для розчинів полімерів»[7].

Динамічної в'язкості залежить від швидкості зсуву для розчинів гіалуронової кислоти з різною молекулярною масою продемонстрована на *рис. 1.2*. Концентрація полімеру у даному випадку становить 10 мг/мл. Варто відзначити, що при високих швидкостях зсуву динамічна в'язкість не залежить від молекулярної маси гіалуронової кислоти. Макромолекули полімеру шикуються в лінію на шляху потоку, і в'язкість може визначатися концентрацією полімеру.

Гіалуронова кислота, яка є популярним компонентом медичних речовин, так само як і інші глікозаміноглікани, може збільшувати осмоляльность розчинів. Чим більше концентрація або вище молекулярна маса ГК, тим більше осмоляльность розчину. Маючи це на увазі, виробники повинні розробляти спеціальні формули для своїх продуктів; проте осмоляльность таких продуктів нелегко аналізувати і порівнювати через безліч різних індексів полідисперсності гіалуронової кислоти, різних буферних розчинів, аддитивних полімерів, консервантів, поверхнево-активних речовин, органічних осмолітов [7].

Таблиця 1.1

Властивості ГК

Властивість	**Гіалуронова кислота (Mw, kDa)**
Гідродинамічний розмір	100, 500, 1000, 3000, 6000
Реологічність	350, 680, 1800 - низькомолекулярна 1000, 2000, 3000, 4000 - середньомолекулярна 125, 241, 390, 598, 800, 961, 1270, 1430, 1620, 1770, 2040, 2150 - високомолекулярна
Поверхневий натяг	100 – 5000
Адгезія	350 – 2000
Оптична густина	1430 – 1500
Швидкість ультразвуку	1430

Вивчення швидкості ультразвуку в різних умовах може бути корисно для виявлення як структурних, так і фізичних властивостей, а також їх змін. Наприклад, макроскопічні і мікроскопічні структурні зміни під час зшивання, стеклования, кристалізації, а також фізичні або хімічні зміни можуть бути проаналізовані за допомогою ультразвукового виявлення без пошкодження зразків.

Швидкість ультразвуку гіалуронової кислоти лінійно залежить від концентрації, як і в безлічі інших розчинів полімерів при низьких концентраціях.

З підвищенням температури зменшення молекулярної маси відбувалося швидше (зразки ГК у формі розчину та порошку). Протягом перших трьох годин нагрівання при температурі 90 ° C (форма порошок і розчин) і 120 ° C (порошок)

зменшення молекулярної маси було набагато більш миттєвим, ніж при більш тривалому впливі більш низької температури. В цілому було зроблено висновок, що розкладання ГК з більш низькою M_W відбувається швидше, ніж з більш високою M_W при помірній температурі (3 год, 60 ° С).

Відомо, що ГК розкладається під впливом активних форм кисню. Є чутливою до впливу різних окислювачів, таких як озон, УФ-світло, перекис водню.

Гіалуронова кислота в нормальних умовах руйнується. Щоб звести до мінімуму втрату молекулярної маси при тривалому зберіганні, ГК можна помістити в холодильник [7].

Сфери застосування

Наявність гіалуронової кислоти в багатьох тканинах і рідинах визначає її широке використання в медицині і косметології. Біологічна активність ГК залежить від її молекулярної маси. Високомолекулярна ГК має протизапальні властивості, а її реологічні характеристики визначають її використання в якості протеза синовіальної рідини при лікуванні різних захворювань суглобів, в косметології і естетичній медицині в якості шкірних наповнювачів і в офтальмології як штучні сльози.

Рис.1.3. «Сфери застосування ГК» [7].

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

Вперше гіалуронову кислоту було виділено в 30-х роках минулого століття. Спочатку гіалуронова кислота отримувалась з тканин тварин - гребінців, очей, хрящів. Гіалуронова кислота, отримана таким способом, мала один вагомий мінус - ніякі методи очищення і фільтрації не могли повністю прибрати залишки білків і пептидів від тваринної сировини. А вони, в свою чергу, взаємодіючи з тканинами організму людини, могли викликати алергічні реакції, що значно зменшувало можливу сферу використання.

Пізніше, в 1989 році, широке застосування набув спосіб виробництва гіалуронової кислоти методом ферментації мікроорганізмів, які могли її синтезувати.

Методом генної інженерії був виведений окремий безпечний для людини штам стрептокока, який формує на поверхні осередків полісахариди, які накопичують гіалуронову кислоту. Насинтезований розчин гіалуронової кислоти очищають, а потім приводять до кінцевої форми – гелеподібну або порошкоподібну.

Метод мікробного синтезу гіалуронової кислоти на основі бактеріального штаму-продуценту є більш економічним, оскільки при введенні його в масштаби виробництва, матиме менші витрати, такі як витрати на тваринну сировину і залежність від сезонних поставок.

Цей спосіб дозволяє отримувати продукт зі стандартними заданими властивостями, який матиме високий ступеня очищення, а, отже, має низьку алергенність, і також вважається етичним по відношенню до природи [6].

Біотехнологічний спосіб отримання заснований на культивуванні мікроорганізмів-продуцентів гіалуронової кислоти. Основними продуцентами на сьогодні є мікроорганізми роду *Streptococcus*, а також генно-інженерні штами *Bacillus subtilis* та *Escherichia coli* [8].

Спосіб отримання гіалуронової кислоти в *Bacillus subtilis* і *Escherichia coli* проходить через плазмідні вектори, де гени для синтезу ферментів, необхідних для продукування ГК, знаходяться під контролем сильного промотора Pgrac [9].

Вивчення ферментів, що каталізують синтез гіалуронової кислоти дозволяє створити рєкомбінантні системи в різних мікроорганізмах. Першим інженерним організмом для отримання гіалуронової кислоти був *Bacillus subtilis*, створений шляхом клонування в його хромосому оперона, який несе ген hasA від стрептокока, під контролем конститутивного промотора. Однак система створена таким чином здійснювала синтез ГК з молекулярною вагою менше $1x10^6$ Да і дуже низьким виходом 3,65 г/л [10].

Під час конструювання в *Escherichia coli* векторів, що експресують гіалуронову кислоту в формі плазмід, було виявлено, що введені таким чином гени (відповідальні за синтез ферментів, які продукують гіалуронову кислоту) є токсичними для клітини, коли їх контроль трансляції є сильним конститутивним промотором [11].

Структура гіалуронової кислоти, що продукується бактеріями *Streptococcus zooepidemicus* є ідентичною до структури людської ГК, яка знаходиться в певній кількості в організмі, тому для біотехнологічного процесу це відіграє величеним плюсом.

Щодо стрептококів , гіалуронансинтаза (hasA, присутня в плазматичній мембрані) є ключовим ферментом для остаточного синтезу гіалуронової кислоти, оскільки вона виконує дві функції: каталізує об'єднання D-глюкуронової кислоти і N-ацетил-D-глюкозамін, і транспортує ланцюг новоствореної гіалуронової кислоти з клітини.

Культивування бактерій роду *Streptococcus* з метою отримання ГК здійснюється, як правило, в періодичних умовах[12].

Узагальнені дані щодо синтезу ГК бактеріями наведено в табл.2.1. Найбільшу кількість ГК (5 г/л) синтезує *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. Даний штам є генетично стабільним та повністю безпечним.

Далі концентрпція гіалуронової кислоти, що склала 3,03 г/л, була одержана також бактерією роду стрептококів, але іншим штамом – *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 .

Bacillus subtilis WB600 синтезує низький вихід концентрації цільвого продукту (3,65 г/л), при чому маючи більші затрати часу на культивування.

Отже , найактивнішим продуцентом гіалуронової кислоти є *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 .

Таблиця 2.1

Особливості одержання гіалуронової кислоти

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація гіалуронової кислоти, г/л	Тривалі сть культивуван ня, год	Умови культивування, особливість процесу	Використана література
Bacillus subtilis WB600	сахароза 20,0 (NH4) 2SO4 3,0 KH2PO4 6,5 Na2HPO4 4,5 цитрат натрія 2,0 MgSO4 · 7H2O 3,0 CaCl2 · 2H2O 0,5 ; лимонна кислота 100 FeSO4 · 7H2O 20,0 MnSO4 · H2O 5,0 CuSO4 · 5H2O 2,0 ZnCl2 2,0	3,65	54	Ферментація при pH 6,0 при температурі 32°C з подачею аераційного повітря	Li, Y., Li, G., Zhao, X., Shao, Y., Wu, M., & Ma, T. (2019). *Regulation of hyaluronic acid molecular weight and titer by temperature in engineered Bacillus subtilis. 3 Biotech, 9(6).* doi:10.1007/s13205-019-1749-x
Streptococcus zooepidemicus ATCC 39920	Сахароза 20,0; гідролізат казеїну 25,0; дріжджовий екстракт 3,5; K_2HPO_4 2,0; NaCl 1,5; $MgSO_4 \times 7H_2O$ 0,4.	5	28	Ферментація при pH 7,0 при температурі 37°C з подачею аераційного повітря	Rangaswamy, V., & Jain, D. (2007). An efficient process for production and purification of hyaluronic acid from Streptococcus equi subsp. zooepidemicus. Biotechnology Letters, 30(3), 493–496. doi:10.1007/s10529-007-9562-8
Streptococcus zooepidemicus ATCC 35246	Глюкоза 50,0 дріжджовий екстракт 5,0 K_2HPO_4, 2,0 KH_2PO_4, 2,0 $MgSO_4$, 0,5 $(NH4)_2 SO_4$, 0,5 Пептон 15	3,03	28	Ферментація при pH 7,0 та температурі 37°C З подачею аераційного повітря	Prasad, S. B., Jayaraman, G., & Ramachandran, K. B. (2009). *Hyaluronic acid production is enhanced by the additional co-expression of UDP-glucose pyrophosphorylase in Lactococcus lactis.*

					Applied Microbiology and Biotechnology, 86(1), 273–283. doi:10.1007/s00253-009-2293-0

Таблиця 2.2

Вартість компонентів поживного середовища для культивування продуцентів гіалуронової кислоти

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3, 4)*
Bacillus subtilis WB600	Сахароза 20,0	90	1,8	1
	$(NH_4)_2SO_4$ 3,0	20	0,06	2
	KH_2PO_4 6,5	80	0,28	3
	Na_2HPO_4 4,5	110	0,495	1
	цитрат натрія 2,0	85	0,17	1
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 3,0	9,2	0,027	1
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,5	40	0,02	1
	лимонна кислота 100	100	10	1
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 20,0	25	0,5	1
	$MnSO_4 \cdot H_2O$ 5,0	9,2	0,0046	4
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 2,0	125	0,25	2
	$ZnCl_2$ 2,0	150	0,3	1
	Вартість 1 л середовища – 13,90 грн			
Streptococcus zooepidemicus ATCC 35246	Глюкоза – 50	65	3,2	1
	Дріжджовий автолізат –5	1250	6,25	1
	K_2HPO_4 – 2	60	0,12	1
	KH_2PO_4 – 2	80	0,16	1
	$(NH_4)_2SO_4$ – 5	20	0,1	1
	Триптон –10	275	2,75	4

Streptococcus zooepidemicus ATCC39920				
	Вартість 1 л середовища – 12,58 грн			
	Сахароза 20,0	90	1,8	1
	гідролізат казеїну 25,0	265	6,62	1
	дріжджовий екстракт 3,5	1250	4,37	3
	K_2HPO_4 2,0;	120	0,24	1
	NaCl 1,5;	60	0,09	2
	$MgSO_4 \times 7H_2O$ 0,4.	9,20	0,00368	3
	Вартість 1 л середовища – 13,12 грн			

Примітка. * - Ціни наведено станом на травень 2020р. 1. https://prom.ua, 2. https://russian.alibaba.com, 3. http://store-ds.com.ua

Отже, за даними наведеними у таблиці 2.2 можна зробити висновок, що середовище для культивування *Bacillus subtilis* WB600 є найдорожчими, що є економічно не вигідно використовувати на виробництві, при цьому даний штам синтезує гіалуронову кислоту з низькою кількістю концентрації.

Бактеріальні штами роду *Streptococcus* мають невелику різницю в ціні поживних середовищ для культивування, але вихід гіалуронової кислоти в *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 є значно нижчим.

Для того, щоб остаточно обрати біологічний агент на третьому етапі розраховуємо умовну вартість одиниці активності (табл.2.3).

Таблиця 2.3

Умовна вартість одиниці активності гіалуронової кислоти

Біологічний агент	Вартість 1 л середовищ, грн	Теоретично можливий вихід продукту, г/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г	Кількість утвореної ГК за год, мг/год
Bacillus subtilis WB600	13,90	3,65	3,80	0,25
Streptococcus zooepidemicus				

ATCC 35246	12,58	3,03	4,15	0,44
Streptococcus zooepidemicus ATCC39920	13,12	5	2,62	0,46

Отже, проаналізувавши інформацію, можна зробити висновок про наведену різницю вартості компонентів поживних середовищ.

Оскільки штам *Streptococcus zooepidemicus* ATCC39920 продукує найвищу концентрацію гіалуронової кислоти, а також має середню вартість компонентів поживних середовищ, можемо зробити висновок, що саме цей штам продуцента підійде для біосинтезу продукту .

2.2. Розрахунок складу поживного середовища для продуцента культивуванні *Streptococcus zooepidemicus* ATCC39920

Тривалість культивування 28 год., вихід цільового продукту – 5 г/л.

Потреби для синтезу гіалуронової кислоти. Розрахуємо, скільки вуглецю міститься в 5 г ГК. Молекулярна маса ГК ($C_{28}H_{44}N_2O_{23}$) становить 776. Отже, у 776 г ГК міститься 336 г вуглецю, а в 5 г гіалуроновій кислоті $(5 \times 336) / 776 =$ 2,16 г вуглецю.

Далі розрахуємо, у скількох грамах сахарози міститься 2,16 г вуглецю. $X = 2,16 \times 342,3/144 = 5,13$ г/л.

Враховуючи, що при вирощуванні мікроорганізмів на сахарозі близько 40 % субстрату окиснюється до CO_2 для одержання енергії, необхідної для конструктивного метаболізму, вміст сахарози у середовищі становитиме: $(5,13 \times 0,4) + 5,13 = 7,18$ г/л.

Потреби для синтезу біомаси.

У біомасі міститься 50 % вуглецю, отже вміст вуглецю у 4,61 г біомаси становить 4,61 × 0,5 = 2,3 г. Ця кількість вуглецю міститься у (2,3 × 342,3) / 144 = 5,47 г вуглеводів.

Отже, загальний вміст сахарози у середовищі, необхідний для синтезу біомаси (5,13 г/л) та гіалуронової кислоти (5 г/л), становить 5,13+ 5 = 10,13 г/л.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення

Потреби для синтезу біомаси. Припустимо, що у біомасі міститься 10 % азоту. Таким чином, у 4,6 г біомаси вміст азоту становить 1,03 г. Для одержання ГК в промислових умовах використовується середовище, яке містить як джерело мінерального азоту дріжджовий екстракт.

Розрахуємо кількість дріжджового екстракте , необхідну для одержання 4,61 г/л біомаси. Зробимо перерахунок на азот по складу дріжджового екстракту:

Аспарагінова кислота (8 %), Глутамінова кислота (11,9 %), Ізолейцин (4,7%), аланін (5,6%) , валін (3,6%), аргінін (1,3%), лізин (6,8%), гліцин (3,1%). З перерахунком на Нітроген сума складу дріжджового екстракту становить 31,74 г. складемо пропорцію :

100 г – 31,74

х г – 3,5 г

х = 11 г

Для одержання 4,61 г/л біомаси вміст дріжджового екстракту у середовищі для культивування повинен становити 3,5 г/л.

Розрахунок вмісту азоту в гідролізаті казеїну. Вміст азоту в гідролізаті казеїну складає 8 %. Отже, 4,61×0,8 = 3,68 г.

Розрахунок вмісту фосфору у середовищі. У біомасі міститься близько 3 % фосфору. Отже, для синтезу 4,61 г/л біомаси вміст фосфору у середовищі повинен становити 4,61 × 0,03 = 0,13 г/л.

Джерелами фосфору у промисловому виробництві ГК двозаміщений калій фосфорнокислий – K_2HPO_4. Розрахуємо в якій кількості K_2HPO_4 міститься 0,03 г фосфору. Х = 136 × 0,1 / 31 = 6 г/л. Отже для синтезу 4,61 г/л біомаси в середовищі має міститись 6 г фосфору.

2.3. Морфолого-культуральні ознаки

Streptococcus equi subspecies zooepidemicus (Streptococcus zooepidemicus) є бета-гемолітичною грампозитивною бактерією групи *Lancefield* групи С. Клітини кулястої форми, нерухомі, не утворюють спори, діаметром менше 2 мкм, розташовуються попарно або ланцюжками. При посіві на агар колонії зазвичай мають діаметр 0,5-1,5 мм, круглі і непрозорого кольору. Вони також мають гладку, опуклу поверхню.

Факультативні анаероби, оптимальна температура росту становить 37 градусів, pH 6-7. Відносно антибіотиків *Streptococcus. zooepidemicus* дуже чутливий до пеніциліну, ампіциліну, нітрофуранів та еритроміцину. Штам є лактозо-позитивним і здатний ферментувати сорбіт, але не трегалозу. Крім того, ферментує D-глюкозу, лактозу, мальтозу, сахарозу, D-сорбіт і крохмаль, але негативний для інших, таких як D-маніт, гліцерин і інулін. Побічні продукти з *Streptococcus zooepidemicus* ферментації є гіалуронова і молочна кислота. Процес ферментації регулюється виробленням гіалуронової кислоти [13].

2.4 Таксономічний статус біологічного агента

Таксономічний статус біологічного агента. Сучасна (філогенетична) класифікація для *Streptococcus zooepidemicus* наведена згідно другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій [13].

Домен – *Bacteria*

Відділ – *Firmicutes*

Клас – *Bacillales*

Родина – *Streptococcaceae*

Рід – *Streptococcus*

Вид –*zooepidemicus*

РОЗДІЛ 3 ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1 Потреба у цільовому продукті

Природне вироблення гіалуронової кислоти всередині організму після 25-30 років вже не покриває його зростаючі потреби, що обумовлюється певними змінами, які легко ідентифікуються навіть «на око». Також відбуваються дистрофічні процеси (втрата або розлад функцій) у внутрішніх органах, що викликає больові відчуття і вимагає застосування ГК разом з вітамінами і низкою спеціальних лікарських речовин [14].

Дефіцит гіалуронової кислоти в організмі людини призводить до таких наслідків:

- Дискомфорт в суглобах (особливо в колінних)
- Сухість, зневодненення шкіри, мімічні зморшки
- Повільний процес регенерації епідермісу
- Зменшення вмісту гіалуронової кислоти в склоподібному тілі ока як причина розвитку катаракти.

Розглянемо потребу гіалуронової кислоти в якості застосування як замінника синовіальної рідини, для лікування хвороби у людей – остеоартрозу.

З розвитком остеоартрозу природна концентрація і середня молекулярна маса ГК зменшується, що призводить до порушення структурних і біомеханічних властивостей суглоба. Збільшення в ньому рівня ГК шляхом внутрішньосуглобових ін'єкцій сприяє відновленню в'язко-еластичних властивостей синовіальної рідини, надає хондропротекторну, протизапальну та знеболювальну дії.

Завдяки нормалізації якості синовіальної рідини та активації процесів оновлення тканин у суглобовому хрящі гіалуронова кислота поліпшує функцію суглобів.

В даний час зростає популярність неоперативних методів лікування, які здатні викликати самовідновлення організму та відновлення після травм або

просто покращення симптомів без відповідних вторинних ефектів. Ці терапії включають ін'єкції гіалуронової кислоти, які включені до нової терапевтичної галузі ортобіологія [15].

В одному клінічному дослідженні порівнювали внутрішньосуглобове введення гіалуронової кислоти та кортикостероїдів при остеоартрозі трапеціеп'ясткового суглоба. За даними дослідження, ГК та кортикостероїди мають однакову ефективність щодо рівня зменшення вираженості болю. Однак гіалуронова кислота має більш тривалий ефект [16].

3.2 Розрахунок потужності виробництва

Остеоартроз колінного суглоба, підтверджений рентгенографічно, є близько 20% населення України, тобто 8,8 млн. осіб у віці після 50 років. Остеоартроз може бути тяжкої, середньої та легкої форми. Пропонується розглянути потребу в гіалуронвой кислоті в ролі замінника синовіальної рідини для усунення проблеми остеоартрозу легкої форми. Всі інші форми остеоартрозу лікуються більш серйозними варіантами медичних терапій. Припустимо, що із 8,8 млн. осіб близько 20 % мають легку форму остеоартрозу. Тоді кількість осіб буде :

8,878 млн – 100 % ; X – 20%

X = 1 775 600 осіб

Отже, 1 651 305 осіб мають потребу в гіалуронової кислоті для лікування остеортрозу легкої форми.

Станом на 2021 рік, в Україні ін'єкції для лікування остеоартрозу закуповують із закордону.

Пропонується розглянути варіанти лікарських засобів із вмістом гіалуронової кислоти, що виробляються іншими країнами та представлені на українському фармацевтичному ринку.

В таблиці 3.1. наведений перелік препартів різних країн імпортерів, які використовуються для лікування остеоартрозу.

Таблиця 3.1.

Перелік ін'єкційних препаратів, що представлені на українському фармацевтичному ринку

Назва препарату	Виробник	Вміст натрій гіалуронат у 2 мл розчину, мг [26]	Ціна, грн
Гіалган [17]	Фідія Італія	20/2 мл	677
Суплазин-1-SHOT[18]	Біонік Тео, Ірландія	60/6 мл	4149
Сертобек-про[19]	Ворд Медесин, Великобританія	60/3 мл	3113
Ферматрон плюс[20]	Хайєлтек, Великобританія	30/2 мл	2200
Остеніл плюс [21]	Хімедіка Германія	40/2 мл	3050

Оскільки на фармацевтичному ринку Укрііни предствлений широкий спектр препаратів, тому пропонується виробляти гіалуронову кислоту для одного фармацевтичного виробництва, який випускає препарат «Гіалган».

Даний препарт має бюджетну ціну, враховуючи, що препарат «Гіалган» потрібно використати 5 разів (курс становить 5 тижнів, по 1 разу на тиждень) одній людині це буде коштувати 3385 грн. Враховуючи те, що остеоартроз це хвороба, яка має найбільший відсоток по захворюваності населення у віці 50 років і старше, середньостатистичній людині такого віку ціна за 5 таких ін'єкцій буде підходити найкраще.

Станом на 2021 рік в Україні ін'єкцію для лікування остеоартрозу постачає «Фідія Фармацевтика», але сам препарат «Гіалган» створюється в Італії.

Для розрахунку потреби препарату «Гіалган» припустимо, що виробництво буде конкурентно спроможним за умови покриття 1% фармацевтичного ринку, тоді кількість осіб складе :

1 775 600 осіб – 100 %; X осіб – 1 %

X = 17 756 осіб.

Отже, для забезпечення такої кількості осіб, що мають потребу в лікуванні остеоартрозу, кількість препарату (мг) складе: 17 756 осіб×100 мг = 1 775 600 мг.

Таблиця 3.2

Річна потреба населення в гіалуроновій кислоті

Потреба у гіалуроновій кислоті	Доза препарату на добу, мг[33]	Тривалість прийому, днів	Кількість препарату на одну людину,мг	Кількість хворих	Кількість препарату на хворих, мг
Замінник синовіальної рідини	20	1 раз на тиждень Курс 5 тижнів	100	17 756	1 775 600

Кількість синтезованої ГК продуцентом *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 становить 5 г у 1 л культуральної рідини. Тривалість культивування *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 становить 28 годин.

Кількість культуральної рідини, необхідної для отримання 1 775 600 мг (1775,6 г) становить:

5 г – 1 л

1775,600 г – Х л

Х = 355,120 л культуральної рідини

Враховуючи сумарні втрати цільового продукту при виділенні (38 %), необхідно отримати таку кількість культуральної рідини:

$$355{,}120 / 0{,}62 = 572{,}774 \text{ л}$$

3.3.Розрахунок об’єму ферментера та кількості виробничих циклів

Для забезпечення ГК, потрібно одержати 572,774 л культуральної рідини. Розрахуємо скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації, аби розрахувати кількість стадій приготування посівного матеріалу.

Streptococcus zooepidemicus ATCC 39920 продуцент під час синтезу гіалуронової кислоти становить 5 г/л цільового продукта [12].

Мінімально можлива кількість робочих днів, які можуть бути використані для виробництва продукції становить 30 днів, максимальна – 330 днів. Приймемо, що для даного виробничого процесу необхідно 310 трудоднів.

Для проведення подальших розрахунків приймемо наступні початкові дані: час циклу роботи ферментера:

$$Т_{ЦФ} = Т_{Ф} + Т_{ПО} = 28 + 10 = 38 \text{ год},$$

де $Т_{Ф}$ – час культивування; $Т_{ПО}$ – час проведення підготовчих операцій

Тцф = 38 год. цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (28 год.) та час підготовки ферментера до роботи (10 год.). Підготовка ферментера включає: миття та огляд (2 год.), перевірка на герметичність (2 год.), стерилізація (2 год.), охолодження (1 год), завантаження середовища (1,5 год.), засів (0,5 год.), вивантаження культуральної рідини (1 год.).

Для отримання натрій гіалуронат для подальшого створення ін'єкційного препарату потрібно одержати 572,774 л гіалуронової кислоти.

Приймаємо кількість робочих трудоднів (Трд) 300, тоді кількість продукту на добу (Vд) становитиме:

$$Vд = Vгп/Трд=572,774/310 = 1,8 \text{ м}^3$$

Кількість продукту за цикл (Vкр) буде становити:

$$Vкр=(К_1 \times Vд \times Тцф)/24=(1,1 \times 1,8 \times 38)/24= 3 \text{ м}^3/\text{цикл}$$

При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, враховуючи те, що даний продуцент є факультативним анаеробом і повітря до ферментаційного обладнання подаватися буде в невеликому об'ємі, то приймемо втрати – 1%.

Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{ф} = V_{кр}/(1-Е_{ф}) = 3/ 0,9 = 3,3 \text{ м}^3$$

Виробничий біосинтез здійснюється в ферментері з робочим об'ємом 3,3 м^3.

При вибраному коефіцієнті заповнення ферментера $К_{зф}$ = 0,6 його приблизний геометричний об'єм складе :

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

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер Vнпа = 6,3 м^3

3.4.Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Необхідно синтезувати 3,3 м^3 культуральної рідини. При одержанні даної кількості культуральної рідини необхідно врахувати втрати які відбуваються в результаті крапловиносу, в розмірі 10%.

$$V_{\text{роб.1}} = \frac{V_{\text{пц}}}{1-\text{Е}_{\text{ф}}} = \frac{3,3}{1-0,1} = 3,66 \text{ м}^3$$

При вибраному коефіцієнті заповнення $К_{зап}$ = 0,6 розраховуємо можливий геометричний об'єм ферментера ($V_ф$), що становить:

$$V_{\text{ф}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{\text{К}_{\text{зап}}} = \frac{3,66}{0,6} = 6,1 \text{ м}^3$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_ф$ = 6,3 м^3, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$\text{К}_{\text{зап}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{V_{\text{ф}}} = \frac{3,66}{6,3} = 0,58$$

Кількість посівного матеріалу для ферментера ($Е_{ф1}$) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс1}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{1+\text{Е}_{\text{ф1}}} = \frac{3,66}{1+0,1} = 3,32 \text{ м}^3$$

Кількість посівного матеріалу становить:

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

Для одержання 0,34 м^3 посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря ($Е_{ф2}$), в розмірі 10 %. Кількість поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = \frac{V_{\text{пм1}}}{1-\text{Е}_{\text{ф2}}} = \frac{0,34}{1-0,1} = 0,377 \text{ м}^3$$

При вибраному коефіцієнті заповнення $К_{зап}$ = 0,6 розраховуємо можливий геометричний об'єм ферментера ($V_ф$), що становить:

$$V_{\text{ф}} = \frac{V_{\text{роб.}}}{\text{К}_{\text{зап}}} = \frac{0,377}{0,6} = 0,628 \text{ м}^3$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_ф$ = 0,63 м^3, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$К_{зап} = \frac{V_{роб.2}}{V_ф} = \frac{0,377}{0,63} = 0,59$$

Кількість посівного матеріалу для ферментера ($Е_{ф2}$) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері буде становити:

$$V_{пс2} = \frac{V_{роб.2}}{1+Е_{ф2}} = \frac{0,377}{1+0,1} = 0,342 \text{ м}^3$$

Кількість посівного матеріалу становить:

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

Для одержання 35 л посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря ($Е_{ф2}$), в розмірі 10 %. Кількість поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті становитиме:

$$V_{роб.3} = \frac{V_{пм2}}{1-Е_{ф2}} = \frac{35}{1-0,1} = 38,9 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення $К_{зап}$ = 0,7 розраховуємо можливий геометричний об'єм ферментера ($V_ф$), що становить:

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

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_ф$ = 0,06 м^3, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$К_{зап} = \frac{V_{роб.2}}{V_ф} = \frac{38,9}{60} = 0,64$$

Кількість посівного матеріалу для ферментера ($Е_{ф2}$) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері буде становити:

$$V_{пс3} = \frac{V_{роб.1}}{1+Е_{ф2}} = \frac{38,9}{1+0,1} = 35,4 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить:

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

Для одержання 3,5 л посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря ($Е_{ф2}$), в

розмірі 10 %. Кількість поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.4}} = \frac{V_{\text{пм3}}}{1-\text{Е}_{\text{ф2}}} = \frac{3,5}{1-0,1} = 3,89 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення $К_{зап}$ = 0,75 розраховуємо можливий геометричний об'єм ферментера ($V_ф$), що становить:

$$V_{\text{ф}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{\text{К}_{\text{зап}}} = \frac{3,89}{0,75} = 5,18 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_ф$ = 6 л, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$\text{К}_{\text{зап}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{V_{\text{ф}}} = \frac{3,89}{6} = 0,64,$$

дане значення не значно перевищує задане значення тому можна залишити об'єм ферментера 6 л.

Кількість посівного матеріалу для ферментера ($Е_{ф2}$) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища буде становити:

$$V_{\text{пс4}} = \frac{V_{\text{роб.4}}}{1+\text{Е}_{\text{ф2}}} = \frac{3,89}{1+0,1} = 3,53 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить:

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

Кількість інокуляту для засіву посівного апарату $V_{пм4}$ = 0,36 л можна одержати культивуванням бактерій у колбах. Для цього використовують колби об'ємом $V_{колб}$ = 750 мл з коефіцієнтом заповнення $К_{зк}$ = 0,2.

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме:

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

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 3 колби.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу ГК у ферментері об'ємом 6,3 $м^3$ з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у 4 етапи.

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ГІАЛУРОНОВОЇ КИСЛОТИ

Джерелом вуглецю та енергії при вирощуванні *Streptococcus zoopidemicus* є сахароза.

Так як у Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes відсутня інформація про шляхи катаболізму ростового субстрату у штаму *Streptococcus zoopidemicus* ATCC 39920, тому для побудови шляху метаболізму біосинтезу цільового продукту використала інші іноземні статті, оскільки серед наявних штамів у Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes також не знайдено інформації самого синтезу[22].

Базуючись на таких припущення та використовуючи як основу для створення катаболічного шляху сахарози, катаболізм цукрі – гліколіз (шлях Ембдена-Меєргофа-Парнаса), що представлений у Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes та іноземної статті, наводимо схему перетворення сахарози (*рис 1*).

Сахароза за участю системи сахарози PTS EIIBCA (КФ: 2.7.1.211); перетворюється на сазарозу-6-фосфат, далі за допомогою ферменту бета-фруктофуранозидази (КФ: 3.2.1.26) перетворюється на фруктозу- 1-фосфат, де остання за дії глюкозо-6-фосфат ізомерази (КФ 5.3.1.9) перетворюється на β-D-фруктозу 6-фосфат. Фосфофруктокіназа (глюкокіназа) (КФ 2.7.1.11) активує перетворення β-D-фруктози 6-фосфат у β-D-фруктозу 1,6-фосфат. Ферментативна дія фруктозодифосфат альдолази (КФ 4.1.2.13) на β-D-фруктозу 1,6-фосфат зумовлює перетворення її на гліцеральдегід 3-фосфат та діоксіацетонфосфат, який під дією тріозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1) перетворюється на гліцеральдегід 3-фосфат .

До подальшого катаболізму сахарози залучається гліцеральдегід 3-фосфат, під дією гліцеральдегідфосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12) він перетворюється на гліцерат 1,3-фосфат, що у свою чергу під дією фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3) переходить у гліцерат 3-фосфат.

Дія фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.12) на гліцерат 3-фосфат індукує його перетворення на гліцерат 2-фосфат. Під дією енолази (КФ 4.2.1.11) гліцерат 2-фосфат переходить у фосфоенолпіруват. Кінцевою стадією перетворення є утворення пірувату з фосфоенолпірувату під дією піруваткінази (КФ 2.7.1.40).

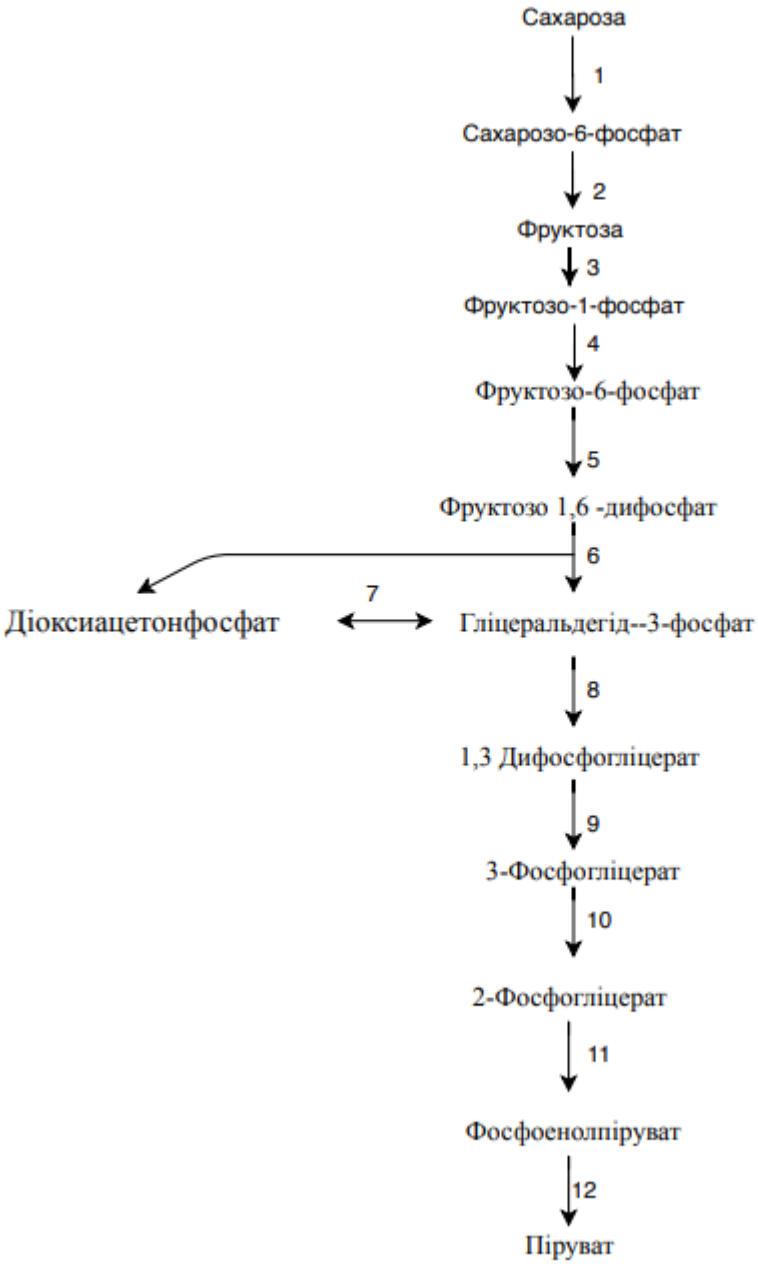


Рис 1. Катаболізм сахарози. Шлях Ембдена-Меєйргофа-Парнаса

Ферменти: 1 – система сахарози PTS EIIBCA (КФ: 2.7.1.211); 2 – бета-фруктофуранозидаза (КФ: 3.2.1.26); 3 – фруктокіназа (КФ: 2.7.1.4)

4– глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.9); 5 – фосфофруктокіназа (глюкокіназа) (КФ 2.7.1.11); 6 – фруктозодифосфат альдолаза (КФ 4.1.2.13); 7 –

тріозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1); 8 – гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 9 –фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 10 – фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12); 11 – енолаза (КФ 4.2.1.11); 12 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40).

4.2. Біотрансформація сахарози у гіалуронову кислоту

Під час росту *Streptococcus zoopidemicus* ATCC 39920 з використанням сахарози як джерела вуглецю, внаслідок катаболізму жирних кислот, утворюється ацетил КоА, з якого далі можуть синтезуватися ацетат та етанол.

Далі ацетил-КоА залучається до циклу трикарбонових кислот (ЦТК).

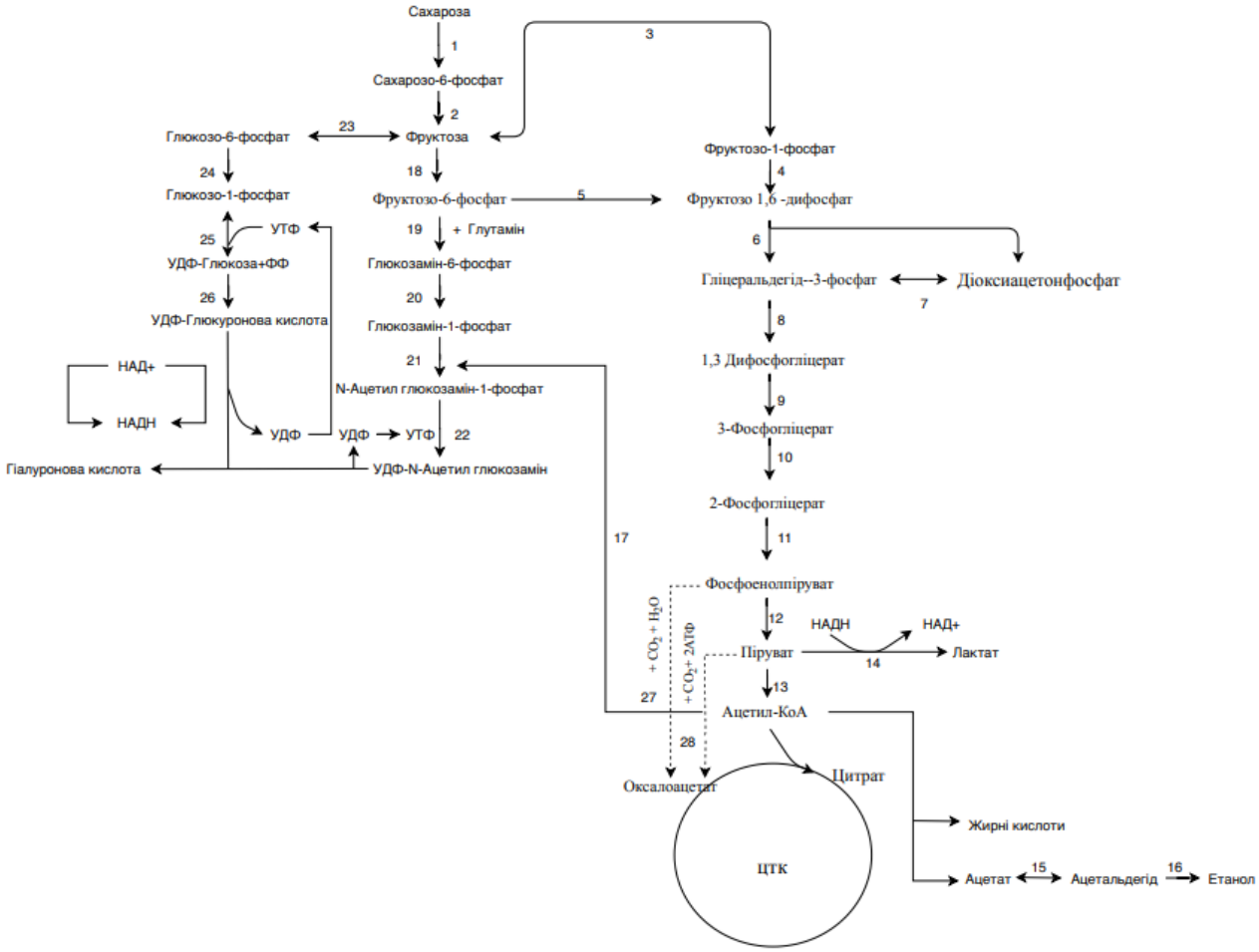
Анаплеротичними реакціями, які забезпечують поповнення втрат інтермедіатів ЦТК є карбокислювання ФЕП та пірувату.

За допомогою L-лактатдегідрогенази (КФ: 1.1.1.27) утворюється молочна кислота, яка має функцію інгібувати концентрацію гіалуронової кислоти [дод.2]

Фруктоза розпадається на глюкозо-6-фосфат. Катаболізм глюкозо-6-фосфат відбувається з утворенням глюкозо-1-фосфату та УДФ-глюкози. Кінцевим продуктом є УДФ-глюкуронова кислота, яка залучається вже до синтезу гіалуронової кислоти. [дод.3,4]

Фруктоза-6-фосфат ізомеризується за рахунок глутаміну, як донора аміногрупи та ферменту глютамін --- фруктоза-6-фосфатна трансамінази (КФ: 2.6.1.16). Наступна реакція з Ацетил-КоА дає глюкозамін-1-фосфат, який зв’язується с УДФ, утворюючи УДФ- N-ацетил глюкозамін. [дод.5]

В парі УДФ - N-ацетил глюкозамін та глюкуронова кислота починають синтезувати гіалуронову кислоту під впливом фермента гіалуронан-синтази (КФ: 2.4.1.212), яка потім буде складатися з повторів повторів дисахаридів глюкуронової кислоти і N- ацетилглюкозамінів, поперемінно сполучених β-1-3 і β-1-4 глікозидними зв’язками. [дод.6]



Умовні позначення: - основний шлях біосинтезу; - - - анаплеротичні реакції;

Ключові ферменти: 1. система сахарози PTS EIIBCA (КФ: 2.7.1.211); 2. бета-фруктофуранозидаза (КФ: 3.2.1.26); 3. 1-фосфофруктокіназа (КФ: 2.7.1.56); 4.1-фосфофруктокіназа (КФ: 2.7.1.56); 5. 3-фруктозо-1,6-біфосфатаза (КФ 3.1.3.11); 6.фруктозодифосфатальдолаза (КФ 4.1.2.13); 7.триозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); 8.гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 9.фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 10. 2,3-дифосфатзалежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11), фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12); 11. енолаза (КФ 4.2.1.11); 12.піруваткіназа (КФ 2.7.1.40); 13. піруватдегідрогеназа (КФ 1.2.4.1); 14. L-лактатдегідрогеназа (КФ: 1.1.1.27); 15.ацетил-КоА синтетаза (КФ: 6.2.1.1); 16.алкогольдегідрогеназа (КФ 1.1.1.1); 17. N-ацетилглюкозамін-6-фосфатна деацетилаза (КФ: 3.5.1.25); 18. фруктокіназа (КФ: 2.7.1.4); 19. За рахунок глутаміну,як донора аміногрупи та ферменту глютамін --- фруктоза-6-фосфатна трансаміназа (ізомеризується) (КФ: 2.6.1.16); 20. фосфоглюкозамін мутаза (КФ: 5.4.2.10); 21. глюкозамін-1-фосфат N-ацетилтрансфераза (КФ: 2.7.7.23 2.3.1.157); 22. УДФ-N-ацетилгалактозаміндифосфорилаза (КФ: 2.7.7.23 2.7.7.83); 23. глюкозо-6-фосфатна ізомераза (КФ: 5.3.1.9); 24. фосфоглюкомутаза (КФ: 5.4.2.2); 25. УТФ - глюкозо-1-фосфатна

уридиліltрансфераза (КФ: 2.7.7.9); 26. УДФ-глюкоза 6-дегідрогеназа (КФ: 1.1.1.22). 27. гіалуронан-синтаза (КФ: 2.4.1.212).

РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Перед тим як обрати ферментер, що буде використовуватися для синтезу гіалуронової кислоти, необхідно визначити, які умови проведення процесу ферментер повинен забезпечувати. Такі умови завжди залежать від способу культивування і фізіолого-біохімічних особливостей продуцента. Отже, спочатку проаналізуємо ці властивості у бактерій *Streptococcus zoopidemicus* ATCC 39920:

По відношенню до кисню продуцент – факультатиний анаероб. Факультативний анаероб може рости без або в присутності кисню, оскільки метаболізує енергію аеробно або анаеробно.

При глибинному культивуванні мікробні клітини *Streptococcus zooepidemicus* ростуть у всьому обсязі рідкого поживного середовища, в якому вони суспендовані.

Даний спосіб дає можливість оперативного контролю процесу культивування і при необхідності можливість втручання в процес.

pH кисле, оптимальне значення для росту і біосинтезу лежить у межах від 6,0 до 7,2. Якщо pH нижче 6,0 і вище 7,2 розвиток бактерій призупиняється.

Streptococcus zooepidemicus є мезофілами, температурний оптимумом становить 37,0 °С. За таким показником найкраще відбувається ріст бактерій, в результаті біосинтез цільового продукту є кращим.

Бактерії *Streptococcus zooepidemicus* ATCC39920 не здатні до утворювання спор.

Для засіву виробничого середовища при глибинному культивуванні засівний матеріал готують також глибинним способом.

Засівний матеріал вносять в ферментер в кількості 1-15% (в нашому випадку 10 %) , яка залежить від питомої швидкості росту продуцента.

Періодичний спосіб культивування є домінуючим режимом виробництва гіалуронової кислоти, оскільки може скоротити час ферментації і, таким чином, збільшити продуктивність ГК [20].

Також однією з переваг періодичного культивування є можливість регулювання швидкості росту, яку можна порівнювати зі швидкістю подачі кисню.

У порівнянні з періодичним процесом безперервний спосіб може продовжити період культивування, скоротити час, що витрачається на оборот реактора. Однак одержання гіалуронової кислоти в хемостаті є нелегким через нестабільність гіалуронової кислоти, що продукується висококапсульними штамами стрептококів при високому ступені розведення.

Найбільша швидкість розведення для стабільної продукції ГК в культурі хемостата склала 0,4 год $^{-1}$ [23].

Отже, промислове виробництво гіалуронової кислоти не є доцільним при безперервному культивуванні [24].

Мікробна продукція гіалуронової кислоти із *Streptococcus zooepidemicus* має декілька особливостей під час глибинного культивування, а саме :

-існує сильна конкуренція між синтезом ГК і зростанням клітин для поширених попередників, таких як УДФ - N-ацетил-глюкозамін і УДФ-глюкуронової кислоти.

-молочна кислота є основним побічним продуктом ферментації ГК, а накопичення молочної кислоти призводить до сильного пригнічення росту клітин і її синтезу [25].

-вироблення мікробної ГК із *Streptococcus zooepidemicus* є типовим в'язким процесом, і, таким чином, ефективність перемішування і швидкість масопереносу кисню істотно впливають на вироблення ГК.

Проте, існує значна розбіжність у впливі швидкості перемішування і аерації на вироблення мікробної ГК. Було відзначено, що на вироблення кислоти не впливала швидкість аерації, тоді як вона знижувалася зі збільшенням швидкості перемішування.

Занадто висока швидкість перемішування може викликати пошкодження клітин і привести до зниження концентрації гіалуронової кислоти [26].

Для запобігання контамінації проводиться стерилізація обладнання (інокуляторів, збірників, ферментеру) а також комунікацій та поживних середовищ для культивування гострою парою.

Обґрунтування типу ферментеру

В залежності від умов культивування, конструкція і облаштування ферментера може відрізнятися. Визначившись зі способом культивування та фізіолого-біохімічними особливостями продуцента обираємо необхідне оснащення для ферментера, яке б забезпечило створення даних умов.

Для інтенсифікації масообмінних процесів та кращої гомогенізації культуральної рідини використовується перемішуючий пристрій з частотою обертів 200 об/хв [27].

Оскільки культивування продуцента гіалуронової кислоти передбачає встановлення перемішуючого пристрою, оберемо двох’ярусну лопатеву мішалку. Лопатеву мішалку доцільно застосовувати при перемішуванні з метою суспендування та розчинення компонентів, має просту будову, полегшує миття та конструкцію ферментера, є більш економічною, порівняно з турбінною мішалкою (турбінна мішалка має значно більшу швидкість перемішування поживного середовища, що для цільового продукту є недоречно, оскільки біологічний агент має в своїй будові капсули, які містять гіалуронову кислоту, тому при значному перемішуванні, капсули можуть пошкодитися).

Для подачі повітря і відведення відпрацьованого повітря забезпечується барботер.

Для забезпечення сталої температури культивування ферментер оснащується сорочкою та датчиком контролю температури.

Для контролю рівня pH культуральної рідини ферментер оснащується датчиком контролю pH.

Коефіцієнт заповнення поживним середовищем геометричного об’єму ферментатора становить 0,6. Вільний простір використовується для компенсації підвищення рівня середовища за рахунок збільшення повітря при аерації.

Для того щоб замовити таких параметрів ферментер, можна звернути увагу на виробництво ферментеру фірми «Biorus» (Росія) [https://bio-rus.ru/primeryi-speczifikaczij/promyishlennyij-fermenter-biorus-1000-l-dlya-veterinarii.html/] [26]. На відміну від більшості інших виробників, фірма випускає промислові ферментери різних об'ємів та має на своєму сайті досить якісну характеристику і фото моделей ферментерів[26].

У ферментері даного виробника передбачена автоматична система стерилізації, можливість внесення інокуляту в стерильних умовах, розміщені порти для відбору проб, встановлення датчиків контролю рівня піни, тиску, pH, температури, оптичної густини, передбачається подача газів до ферментеру і наявність перемішуючого пристрою. Для контролю процесів, які протікають в ферментері, він оснащується відповідними датчиками, під'єднаними до автоматизованої системи управління процесом [28].

5.1.2.Обгрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Streptococcus zooepidemicus ATCC 39920 - являється факультативним анаеробом. Процес ферментації може здійснюватися в анаеробних так і в аеробних умовах. Але якщо обрати аеробний спосіб – вихід гіалуронової кислоти буде значно вищим [29].

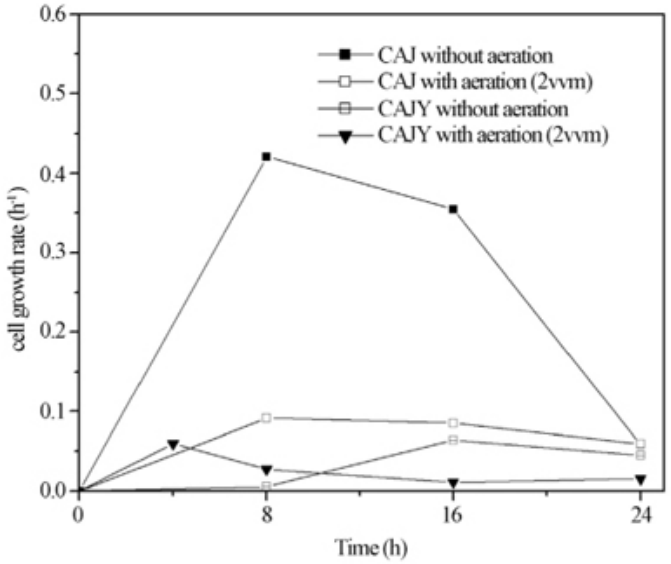


Рис 5.1. «Процес ферментації за умов аерації бактерії *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920» [29].

В лабораторних боксах, де працюють з посівною культурою та інокулятом, для стерилізації повітря використовують ультрафіолетові лампи.

Повітря для вирощування посівного матеріалу та виробничого культивування стерилізують за допомогою фільтрів грубої очистки та індивідуальних фільтрів. Основними вимогами до фільтрувальних волокон є висока пилоємність і здатність до ефективного функціонування за малих перепадів тиску до і після фільтра.

Індивідуальні фільтри встановлюють безпосередньо перед ферментером, посівним апаратом або інокулятором. Головні фільтри заповнюють набивним волокном і встановлюють в цеху ферментації на головному повітряному колекторі стиснутого аераційного повітря. На головних фільтрах видаляється приблизно 98% мікроорганізмів, а на індивідуальних, які заповнюються надтонкими мембранами чи волокнами, затримується до 99,999% мікроорганізмів [30].

5.1.3. Вибір мийних та дезинфікувальних засобів

Метою обробки санітарних приміщень є прибирання приміщень вологим способом з подальшою обробкою дезінфекційними розчинами. Мийні, дезінфекційні та мийно-дезінфекційні розчини повинні забезпечувати знешкодження об’єктів від патогенних і сапрофітних мікроорганізмів, що можуть бути збудниками захворювань і спричиняти псування сировини, напівпродуктів та готової продукції.

Прибирання приміщень проводять вологим способом з подальшою обробкою дезінфекційними розчинами. Для санітарної обробки необхідно застосовувати мийні, дезінфекційні та мийно-дезінфекційні розчини, зареєстровані в Україні та дозволені до застосування.

Щоб обрати мийний та дезинфікувальний засіб, необхідно врахувати його вартість та витрати на обробку потрібної площі виробничого приміщення. Приблизно на 1 $м^2$ витрачається 100 мл робочого розчину мийних чи дезинфікувального засобів [31].

В залежності від основної діючої речовини дезінфікуючі засоби поділяються на декілька основних груп:

1. Галоїдовмісні, у тому числі хлоровмісні.

2. Альдегідовмісні на основі глутарового альдегіду, формальдегіду, альдегіду бурштинової кислоти, гліоксалю.

3. Окисники (кисневовмісні, пероксндянти, пероксисполуки).

4. Спиртовмісні.

5. Поверхнево-активні речовини (ПАР), до яких належать препарати на основі четвертинних амонієвих сполук (ЧАС).Препарати на основі похідних гуанідину.

6. Композиційні препарати на основі різних класів хімічних сполу [32]

«Дезекон» - **у**ніверсальний, високоефективний, економічний, концентрований, композиційний дезінфекційний засіб на основі четвертинних амонієвих сполук, амінів, сінергічно діючих допоміжних компонентів. Поєднує дезінфікуючу, миючу і дезодоруючу дію. Має режими достерилізаційного очищення виробів медичного призначення, поєднаного з їх дезінфекцією. Може використовуватись в ультразвуковому мийному обладнанні. Економічний, має низькі концентрації (від 0,02% за препаратом) і норми витрати робочого розчину (з 1л концентрату можна приготувати до 5000 л робочого розчину [33].

«Хлорантоїн» - це хлоративний, багатокомпонентний, поліфункціональний дезінфекційний засіб з миючиим ефектом. Має бактерицидні, туберкулоцидні, віруліцидні (включаючи збудника поліомієліту, всіх типів грипу, парагрипу, коронарної респіраторно-синцитіальних, ротавірусної, аденовірусної інфекцій, SARS, гепатитів, ВІЛ, вірусних гастроентеритів і інших), спороцидні і фунгіцидні (включаючи збудників кандидозів, дерматомікозів, цвілевих грибів) властивості.

Хлорантоїн видаляє механічні білкові, жирові забруднення, залишки крові, залишки лікарських засобів із зовнішніх поверхонь, внутрішніх каналів та порожнин виробів. За дезінфекційної активності «Хлорантоїн» перевершує в 5-10 разів звичайні дезинфікуючі засоби і виключає застосування лужних миючих засобів. Використання «Хлорантоїну» дозволяє поєднати в одній операції стадії

миття, дезінфекції та предстеріалізації, скоротити тривалість санітарної обробки [34].

«Біонол» - проявляє миючі, емульгуючі властивості, видаляє білкові, жирові забруднення, залишки крові, лікарських і дезінфекційних засобів із зовнішніх поверхонь. Ефективно працює при низьких концентраціях (0,5-2%) у воді будь-якої жорсткості навіть при відсутності гарячої води. Повністю розчиняється в воді [35]

«Еклін – Н» - Концентрований миючий засіб, багатопрофільного призначення, засіб має середовище близьке до нейтрального pH і не містить в своєму складі агресивних хімічних речовин, що дозволяє його використовувати навіть в тих випадках, коли необхідні спеціальні гіпоалергенні засоби. Його можна застосовувати в ручний, механізованої, пінної мийці. Застосування в ЛПУ: миття поверхонь і ПСО (передстерилізаційне очищення) медичного інструментарію, медичних апаратів, приладів і пристроїв, прання білизни.

Застосування в харчовій промисловості: миття поверхонь приміщень, ємностей і технологічного обладнання, санітарно-технічне обладнання, прання білизни, миття посуду (посудумоющая машина).

Вимоги до дезинфікуючих засобів

Дані засоби повинні придержуватися певних вимог: бути добре розчинними у воді; легко і повністю змиватись при сполоскуванні; не мати стійкого запаху і бути безбарвними; не володіти агресивною дією щодо матеріалів, з яких виготовлені обладнання та інвентар; володіти слабкою корозійною активністю; бути стійкими при зберіганні; не знижувати активності протягом тривалого часу; бути пожежо- і вибухобезпечними; бути безпечними для довкілля та повністю розпадатися на нешкідливі сполуки; ¬ мати широкий спектр протимікробної активності; діяти бактерицидно щодо патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів в присутності органічних речовин, солей твердості і мікроорганізмів в біоплівках; ¬ не володіти подразнюючою дією на шкіру рук; за токсикологічною характеристикою бути нетоксичними або малотоксичними [32].

Вартість концентратів мийних та дезинфікувальних засобів та їх витрати при виробництві наведено в *табл. 5.1*.

Таблиця 5.1.

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва гіалуронової кислоти

Назва мийного/ дезінфіку-вального засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концент-рація робочого розчину, %	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфіку-вального засобу, грн
«Хлоратоїн»	Стіни, підлога, вікна, двері	0,2	215
«Дезекон»	Стіни, підлога, вікна, двері, інвентар.	0,2	265
«Біонол»	Обладнання, інвентра, комунікації	0,5	109
Еклін – Н	Обладнання, інвентра, комунікації	2,0	65

Отже, для миття і дезінфекції стін, підлоги, вікон та дверей краще застосовувати «Дезекон» та «Хлорантоїн» з інтервалом у 1,5 місяці, з метою запобіганню резистентності. Ці засоби мають ті функції, які повинні бути доцільно використані під час дезинфекції на виробництві, а саме: обидва засоби ефективні за низьких концентрацій (0,2), а тривалий термін зберігання розчинів та різні діючі речовини, що є важливим, оскільки не буде виникати резистентності мікроорганізмів до дезінфікуючих засобів.

Для миття устаткування і комунікацій, обираємо каустичну соду, яка є хорошим миючим засобом, завдяки лужній реакції добре нейтралізує кислоти, що утворюються в процесі ферментації, а також в порівнянні з іншими мийними засобами – є недорогою.

5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Максимальний синтез гіалуронової кислоти досягається за умов росту штаму *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 на середовищі такого складу (г/л):

Сахароза 20,0; гідролізат казеїну 25,0; дріжджовий екстракт 3,5; K_2HPO_4 2,0; NaCl 1,5; $MgSO_4 \times 7H_2O$ 0,4.

Згідно розрахунків, наведених у розділі 3, виробничий біосинтез здійснюється у ферментері об'ємом 6,3 $м^3$, що містить 3,32 $м^3$ поживного середовища. Одержання інокуляту відбувається в 4 етапи: у колбах на качалці, в інокуляторах об'ємом 6 та 60 л).

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках

Перший етап вирощування посівного матеріалу передбачає культивування в колбах на качалках. Для цього необхідно приготувати 0,36 л поживного середовища у 3 колбах об'ємом 750 мл (див.розділ 3). Для стерилізації компонентів обираємо автоклав з вертикальним завантаженням Panasonic (SANYO) MLS-3781L об'ємом 3 л. Компоненти середовища розбивають на наступні композиції:

Композиція А: Сахароза, гідролізат казеїну, дріжджовий екстракт стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С упродовж 20 хв.

Композиція Б: NaCl, K_2HPO_4 − режим стерилізації: 131 °С, 40 хв.

Композиція В: $MgSO_4 \times 7H_2O$ − режим стерилізації: 131° С, 40 хв.

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторах та посівних апаратах

На другому етапі необхідно одержати 3,53 л поживного середовища. Для цього використовують інокулятор об'ємом 6 л.

Компоненти середовища розбивають на наступні композиції:

Композиція А: сахароза, дріжджовий екстракт та гідролізат казеїну − режим стерилізації: 112 °С, 20 хв.

Композиція Б: NaCl, K_2HPO_4 − режим стерилізації: 131 °С, 40 хв.

Композиція В: $MgSO_4 \times 7H_2O$ − режим стерилізації: 131° С, 40 хв.

Окремо готуємо дріжджовий автолізат, оскільки він містить термолабільні речовини (стерилізація при 112°С).

На третьому етапі необхідно одержати 35,4 л поживного середовища (див.розділ 1). Для цього використовуємо посівний апарат на 60 л. Для стерилізації компонентів обираємо автоклав Tuttnauer D-line 5050 ML об'ємом 100 л.

Компоненти середовища розбивають на наступні композиції:

Композиція А: сахароза , дріжджовий екстракт та гідролізат казеїну - режим стерилізації: 112 ° С, 20 хв.

Композиція Б: NaCl, K_2HPO_4, $MgSO_4 \times 7H_2O$ − режим стерилізації: 131 ° С, 40 хв.

Окремо готуємо дріжджовий автолізат, оскільки він містить термолабільні речовини (стерилізація при 112°С).

Оскільки при стерилізіції основних та фосфорних солей утворюється осад фосфатів магнію, необхідно забезпечити кисле (4,0-4,5) pH середовища, при якому солі не випадають в осад.

Підкислення поживного середовища здійснюють за допомогою 6% розчину HCl у розрахунку 2 мл на 1 л середовища. Тому для 35,4 л поживного середовища композиції Б необхідно 70,8 мл розчину хлоридної кислоти, яка не потребує попередньої стерилізації, розчин готуємо в лабораторних умовах.

Після закінчення стерилізації та охолодження середовища, стабілізують значення pH до 7 6 %-м розчином стерильного гідроксиду натрію у кількості 70,8 мл (стерилізують при 131 °С, впродовж 40 хв).

На четвертому етапі необхідно одержати 342 л поживного середовища (див.розділ 3).

Середовище ділять на такі композиції:

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

Композиція Б: NaCl, K_2HPO_4, $MgSO_4 \times 7H_2O$ − режим стерилізації: 131° С, 40 хв.

Підкислюємо поживне середовище за допомогою соляної кислоти, виходячи з пропорції 2 мл титрувального агента/1 л поживного середовища.
Тому 342 л × 2 = 684 мл 6%-го розчину соляної кислоти необхідно для стерилізації композиції Б в ферментері – 0,63 $м^3$.

Після закінчення стерилізації середовища, стабілізують значення pH до 7 6 %-м розчином стерильного гідроксиду натрію у такій кількості: 342л × 2 =684 мл 6%-го розчину NaOH необхідно для стерилізації композиції Б в ферментері – 0,63 $м^3$.

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу

Останній етап – виробничий біосинтез, об'ємом 3,32 $м^3$ поживного середовища. Середовище ділять на такі композиції:

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

Композиція Б: NaCl, K_2HPO_4, $MgSO_4 \times 7H_2O$ − режим стерилізації: 131° С, 40 хв.

Підкислюємо поживне середовище за допомогою соляної кислоти, виходячи з пропорції 2 мл титрувального агента/1 л поживного середовища.
Тому 3320 л × 2 = 6640 мл 6%-го розчину соляної кислоти необхідно для стерилізації композиції Б в ферментері – 6,3 $м^3$.

Після закінчення стерилізації середовища, стабілізують значення pH до 7 6 %-м розчином стерильного гідроксиду натрію у такій кількості: 3320 л × 2 =6640 мл 6%-го розчину NaOH необхідно для стерилізації композиції Б в ферментері – 6,3 $м^3$.

5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту

В процесі своєї життєдіяльності бактерії *Streptococcus zooepidemicus* ATCC39920 формують капсулу, з метою захисту клітин на різні умови навколишнього середовища (капсули захищають клітини від бактеріофагів і поглинання їх найпростішими, попереджають денатурацію клітинного білка).

Капсула бактерії *Streptococcus zooepidemicus* ATCC39920 – це по суті природний полісахарид, в складі якого містяться залишки ланцюгів макромолекул моносахаридів, такі як глюкуронова кислота (уронові кислоти) та глюкозамін (аміноцукри). Ці два компоненти дають один величезний полімер, з яких і складається гіалуронова кислота. Тому для того, щоб почати процес виділення гіалуронової кислоти спочатку треба зруйнувати капсули клітин *Streptococcus zooepidemicus* ATCC39920.

Щоб скласти стратегію виділення та очищення ГК потрібно враховувати її фізико-хімічні властивості, а саме:

1. аніонний,однолінійний глікозаміноглікан
2. Термолабільність
3. Гідрофільність
4. Оптимальний рівень pH 7,0. ГК. При pH 2,5 ГК набуває вигляд в’язкопружного гелю. При pH вище 11,0 ГК має рідку форму.
5. Наявність великої кількості гідроксильних груп, що призводить до утворення водневих зв’язків, пояснює здатність ГК утримувати воду.
6. Оптично активний полімер, що практично нерозчинний в органічних розчинниках.
7. В очищеному вигляді це білий дрібнодисперсний порошок

По закінченню біосинтезу, гіалуронова кислота містить безліч домішок, які потрібно видалити: часки клітини продуцента, високомолекулярні білки, цукри.

Перед початком виділення ГК, ферментаційну суміш об’ємом 3м^3 перекачують за допомогою перестальтичних насосів до збірника об’ємом 4м^3. Температура зберігання у збірнику підтримується в діапазоні від 15 ° С до 25 ° С, оптимум вважається 20 ° С, рівень pH 7,0.

Першим етапом виділення є руйнування капсул клітин *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 термічним методом. Під впливом температури капсули клітин *Streptococcus zooepidemicus* ATCC39920 починають руйнуватися, це забезпечить вивільненню гіалуронової кислоти в культуральну рідину.

Після цього обов'язковим етапом є відокремлення біомаси, оскільки клітини бактерій більше не потрібні, гіалуронова кислота вивільнилась в культуральну рідину.

Для цього можемо застосовувати різні методи, такі як фільтрація, сепарування, центрифугування.

Після процесу відокремлення біомаси, гіалуронову кислоту потрібно сконцентрувати та здійснити перший етап очищення від домішок. Домішки білків можуть бути присутніми до 0,1 %, оскільки бактеріальні білки та білки, як компонент людського організму мають зовсім різну природу. При використанні ін'єкції із невизначеним відсотком чистоти цільового продукту є ризик небезпеки для людського організму.

Після отримання концентрату гіалуронової кислоти, обов'язково потрібно здійснити процес доочищення від залишку домішок, що могли залишитися на попередніх етапах виділення, а також для отримання високого вмісту чистоти цільового продукту, адже гіалуронова кислота виготовляється для подальшого створення ін'єкційного препарту, який призначений для лікування остеоартрозу. Для процесу доочищення можна виокристати різні групи сорбентів. Але щоб видалити сорбент із гіалуронової кислоти потрібно застосувати також процес фільтрації з певним діаметром пор мембран.

Кінцевий продукт – це сіль натрій гіалуронат. Щоб забезпечити утворення цієї форми, використовуємо хлорид натрію у концентрації 0,9% [37].

Також цей процес має великий плюс – це полегшення подальших механічних процесів очищення, оскільки молекула гіалуронат натрію набагато менша за розміром. Саме розмір формує перевагу гіалуронат натрію. Завдяки невеликим обсягам молекули речовина може легко і безперешкодно проникати, формувати куди більш широкий спектр позитивної дії в організмі. Такі молекули

отримують в процесі гідролізу шляхом від'єднання від гіалуронової кислоти протеїнів, жирів і певних кислот.

При фізіологічному pH кожна карбоксильна група має аніонний заряд, який може бути урівноважений рухомим катіоном, таким як Na^{+}, K^{+}, Ca^{2+} і Mg^{2+}. Отже, у водному розчині ГК має негативний заряд і утворює солі, зазвичай – гіалуронат натрію, який є високогідрофільний і, отже, оточений молекулами води [37].

Зокрема, ГК дуже чутлива до змін pH: в кислому і лужному середовищі виникає критичний баланс між силами відштовхування і тяжіння, а коли pH нижче 4 або вище 11, ГК розкладається шляхом гідролізу.

У процесі гідролізу результат виникає через руйнування водневих зв'язків і гідрофобних взаємодій при збільшенні швидкості зсуву: ланцюги ГК деформуються і вирівнюються по лініях струму потоку, що призводить до зниження в'язкості.

Отже, руйнування полімерних ланцюгів носить тимчасовий і оборотний характер. Ця унікальна реологічна поведінка є своєрідною і надзвичайно важливо, оскільки вона визначає багато фізіологічних ролей у фармацевтичній, медичній, харчовій і косметичній сфері застосування гіалуронат натрію.

Також форма гіалуронат натрія є більш поширеним на ринку. Така форма є більш зручнішою при виробництві фармацевтичних ЛЗ, забезпечуючи мінімізацію пошкодження реологічних властивостей під впливом устаткування та хімічних реагентів [37].

Слід пам’ятати, що ГК має відносну термолабільність. Тому сушіння, в установках з низькою температурою, буде найкращим варіантом.

Отримані коржи із висушеного матеріалу потрібно подрібнити та просіяти. Натрій гіалуронат може зберігатися у вологонепроникних упаковках, в сухому місці при кімнатній температурі не вище 25 ° С. У фіналі процесу очищення цільового продукту, маємо отримати форму солі натрій гіалуронату у вигляді порошку білого кольору.

Виділення і очищення гіалуронової кислоти включає такі етапи:

1. Зберігання культуральної рідини
2. Руйнування капсул бактерій термічним методом
3. Відокремлення біомаси методом сепарування
4. Ультрафільтрація
5. Доочищення за допомогою сорбенту
6. Ультрафільтрація для видалення сорбенту
7. Утворення форми натрій гіалуронат за допомогою солі NaCl
8. Висушування солі гіалуронат натрію;
9. Подрібнення в порошок
10. Просіяння порошку
11. Фасування, пакування, маркування, відвантаження

Вибір способу відокремлення біомаси та відповідного обладнання

Попередня обробка клітин. Оскільки гіалуронова кислота під час біосинтезу накопичується в бактеріальних капсулах *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920, її потрібно вилучити шляхом попередньої обробки клітин. Попередню обробку клітин можна здійснити такими способами:

-Шляхом нагрівання до 70 ° С протягом 1 години.

-Підкислення за допомогою 3-хлороцтової кислоти

Метод нагрівання є простішим, бюджетним способом. Не потребує високих затрат на хімічні реагенти, а час нагрівання складе лише на 1 годину. В свою чергу, 3-хлороцтова кислота коштує значно дорожче, ніж, якщо використати нагрів на 1 годину до 70 ° С, то затрати на електроенергію будуть меншими. Також 3-хлороцтова кислота має 4 ступінь токсичності. В подальшому це ускладнить процес очистки виробництва від хімічних відходів.

Отже, ферментаційну суміш потрібно нагріти до 70 ° С протягом 1 години. Після нагрівання, суміш витримували ще при кімнатній температурі протягом 5 годин.

Під впливом температури структура капсули руйнується, бактерія *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 не є стійкою до температури вище 45 ° С.

Відокремлення біомаси. Цей этап передбачає видалення клітин продуцента. Для цього можемо застосувати методи фільтрування, центрифугування або сепарування. *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 це бактерія. Сама біомаса по своїй природі має здатність до утворення в'язкості. Під час вибору способу відокремлення біомаси, потрібно врахувати, що гіалуронова кислота має здатність змінювати свої реологічні властивості, під хімічним впливом.

- *Фільтрація.*

Процес проходження розчину чи суспензії через пористу перегородку (мембрану) за різницею тиску з обох боків мембрани, причому розмір профільтрованих часточок обмежується діаметром пор.

Суспензія характеризується досить високою ступеню в'язкості та має велику кількість домішок, тому при застосуванні вакуум фільтрів потрібно брати до уваги попередню обробку суспензії, з метою максимально можливої коагуляції клітин і домішок в більші частинки, що легко фільтруються. Але реологічні властивості гіалуронової кислоти значно знизяться, у зв'язку з хімічною дією реагентів. Якщо не брати до уваги попередню обробку, метод відокремлення за допомогою вакуум – фільтрів буде громіздким та економічно невигідним.

- *Сепарування.*

Процес розділення змішаних об'ємів сумішей різної густини, емульсій, суспензій твердих частинок або краплинок в газі.

Є більш доцільним методом, оскільки відсутній негативний вплив фізичних та хімічних факторів на властивості гіалуронової кислоти, а також сепарація має більше переваг, такі як: менші втрати культуральної рідини порівняно з фільтруванням; можливість автоматизувати процес; високий фактор розділення високодисперсних систем.

Центрифугування

Це примусове осадження частинок (речовин) за рахунок швидкості зростання відцентрованих сил.

Цей метод по перевагам схожий на метод сепарування, але фактор розділення є меншим. Хоча такий спосіб дає можливість отримати середовище і клітини, незабруднені фільтратом. Недоліками є високі витрати на електроенергію, профілактичний і капітальний ремонт.

Відділення біомаси на звичайних центрифугах ускладнене, оскільки для перероблення рідин на центрифугах потрібно, щоб концентрація дисперсної фази була не менше ніж 5 % (для центрифуг періодичної дії) або 10 % (для центрифуг безперервної дії), а вміст біомаси в КР не перевищує, як правило, 1...4% .

Для процесу відділення біомаси обираємо сепаратор ALFA LAVAL BTAX 215, що створений спеціально для використання в біотехнологічних процесах, таких як збір клітин, очищення поживних бульйонів і відділення клітинного детриту.

Апарат відрізняється високою ефективністю сепарації і може встановлюватися в замкнутих системах.

Очищення цільового продукту

Оскільки гіалуронова кислота використовується для виробництва ін'єкційного препарату, обов'язковим є етапом вилучення домішок: білки, залишки клітин бактерій.

Основними причинами вилучення білків є:

-Білки можуть залишитися в якості залишку поживного середовище;

-Також білки можуть осісти разом з гіалуроновою кислотою, якщо їх не вилучити перед очищенням на наступних етапів;

-Для отримання певного рівня чистоти подальшого ін'єкційного продукту. Після руйнування капсул клітин, їхні білкові молекули могли також міститься в КР. Природа бактеріальних білків не співпадає з людськими, якщо використати таку ін'єкцію з нечітким вмістом білків у продукті, в результаті, такий препарат здатний викликати зміни в організмі людині небезпечного характеру.

Для домішок обираємо ультрафільтраційну установку. Користуючись даними методички, підбираємо тип мембрани для ультрафільтраційної

установки для ультрафільтрації розчину натрій гіалуронат. Приблизний діаметр молекул натрій гіалуронат складе 26,45 нм або 0,03 мкм. В науковій статті зазначалось використання з діаметром 0,45 мкм. В результаті під час такого процесу, високомолекулярні домішки залишатимуться на поверхні мембрани, а гіалуонова кислота проходитиме крізь мембрану.

Переваги: висока ефективність, низький робочий тиск, тривалий термін служби мембранних елементів, компактне розташування в порівнянні з традиційними схемами, повна автоматизація.

Недоліки: необхідність регулярного промивання, висока вартість обладнання.

Після такого очищення за літературними даними вміст білків становить 1.181 ± 0.142 мг/л [38].

Щоб позбутися від домішок, які могли залишитися на попердніх стадіях очищення, потрібно додати сорбент, для того, щоб здійснити процес адсорбції. Даний етап передбачає кінцеве очищення гіалуронової кислоти, для отримання високого рівня чистоти.

В якості сорбенту можна використати 2 такі сполуки:

- Оксид алюмінію
- Активоване вугілля

За літературними даними двоє сорбентів мають гарний ступінь адсорбції домішок. Але активоване вугілля має відсоток очищення більший (97,4%) порівняно із оксидом алюмінію (87,8 %) [39].

Активоване вугілля здатне адсорбувати органічні речовини, добре адсорбує високомолекулярні речовини і речовини з неполярною структурою.

Активне вугілля додають останнім, перемішують та відстоюють суміш на 1 годину.

Щоб видалити залишок аквтивованого вугілля із гіалуронової кислоти, можна застосувати знову процес ультрафільтрації з діаметром пор 300 кДа.

Далі до гіалуронової кислоти потрібно додати 0,15 М розчину натрій хлор. В результаті ГК здійснить реакцію заміщення між атомами гіалуронової кислоти

та натрій хлору у форму натрій гіалуронат. Цей етап також дозволить зменшити в’язкість розчину та отримати форму, в якій в подальшому буде створюватися інє’кційиий препарат.

Вибір способу сушіння та сушарки.

Гіалуронова кислота є термолабільним продуктом. Тому методи сушіння за температур вище 80 градусів використовувати недоцільно, оскільки це призводить до зміни в молекулярній структурі, які пов'язані зі зміною їх фізичних властивостей. Реологічні властивості чутливі до змін в молекулярній структурі цільового продукту.

Як варіанти, можна розглянути 2 типи сушіння: сушіння сублімацією або вакуумне сушіння.

Вакуум-сушильна шафа. Сушарка працює в періодичному режимі і являє собою шафу циліндричної або прямокутної форми та закривається герметично.

Для зниження втрат теплоти корпус і кришку вакуум-сушильної шафи теплоізолюють. При подачі теплоносія в плити матеріал, що висушується, на полицях нагрівається й з нього випаровується волога. Для зниження температури сушіння процес проводять під вакуумом, пари вологи відводять у конденсатор. При необхідності в процесі сушіння шар матеріалу, що висушується, періодично перемішують.

Перевагою вакуумних сушарок є можливість сушіння матеріалів при невисоких температурах, менша витрата тепла, можливість уловлювання пари цінних компонентів (наприклад, пари спиртів та органічних рідин), кращі санітарні та безпечні умови роботи обслуговуючого персоналу.

Недоліками таких сушарок є низька продуктивність, необхідність застосування ручної праці, більші витрати часу на сушіння, завантаження й вивантаження матеріалу.

Сублімаційне (ліофільне) сушіння використовують для зневоднення живих мікроорганізмів, деяких видів ферментів та інших термолабільних продуктів.

Принцип дії ґрунтується на випаровуванні води із замороженого стану, оминаючи рідкий агрегатний стан. Підведення тепла до матеріалу, що сушиться, здійснюють контактом порівняно теплою поверхнею або радіаційним шляхом.

Для сушіння солі натрій гіалуронату обираємо вакуумну сушарку, оскільки апарати призначені для сушіння порівняно невеликих кількостей вологого матеріалу (15,7 кг).

Подрібнення сухого матеріалу. Після процесу сушіння, цільовий продукт має форму висушених коржів, які потрібно подрібнити, для того щоб на наступних стадіях здійснити розфасовку у відповідному об'ємі. Розмір кристалів солі натрій гіалуронат становить 10 мкм.

При подрібнення використовуємо валову зубчасту дробарку. Зубчасті валкові дробарки використовуються для дроблення крихких матеріалів середньої твердості (вугілля, сіль). Такі валки подрібнюють матеріал шляхом розколювання і роздавлювання, тому що здатні захоплювати шматки з поперечником ¼ - ½ діаметра валка.

Зубчаста дробарка оснащена тихохідними зубчастими валками, які обертаються з однаковою швидкістю (1-1.5 м / сек.). Ведучий валок приводиться в рух від пасових шківів за допомогою зубчастої передачі. Потім, рух передається основному валку.

До основних переваг цих дробарок слід віднести: простоту конструкції, зручність ремонту та обслуговування, меншу кількість пилу, більш низька питома витрата електроенергії в порівнянні з дробарками інших типів.

Фасування та пакування

Фармацевтична галузь є дуже специфічною, тому упаковка повинна бути відповідною до специфіки та призначення фармацевтичної продукції. Відтак і матеріали для її виготовлення слід обирати відповідним чином. Встановлено, що критеріями якості фармацевтичної упаковки є: нешкідливість матеріалу, з якого вона виготовлена, і його сумісність з лікарським препаратом; здатність забезпечити неушкодженість фармацевтич- ної продукції; зручність у вжитку; стійкість до хімічних і фізичних впливів; наявність на ній достатньої інформації про лікарський препарат (назва, тип ліків, склад, номер партії, кількість,

дозування, спосіб вживання, протипоказання, умови зберігання, дата випуску і т. д.); міцність і стійкість; світлонепроникність; бар'єрна стійкість до мікроорганізмів; забезпечення максимального часу зберігання лікарського препарату.

Гіалуронат натрію повинен зберігатися в сухому, прохолодному місці, упаковка має бути вологонепроникною.

Пакувальний матеріал щодо вимог даної субстанції повинен бути:

За призначенням: для сипких речовин

За матеріалами: полімерні

За видами: плівкові, листові.

Гіалуронат натрія можна упакувати по 50 г у форму саше.

Саше - один із виду індивідуальної упаковки. Такі пакети мають високу міцність, надійно захищають упакований продукт від впливів навколишнього середовища.

Продукт у формі солі в умовах високої вологості, при попаданні на металеві поверхні, може викликати корозію металу.

Машини для фасування солі повинні бути виконані з нержавіючої сталі, стійкої до впливу агресивних середовищ.

5.3.Підбір технологічного обладнання для післяферментаційних стадій з урахуванням мітеріальних потоків по стадіям

Підбір технологічного обладнання представений в *табцилі 5.2.*

Вихідні дані:

- об'єм культуральної рідини з однієї ферментації – V кр = 3 м ^{3};
- b. Концентрація цільового продукту у КР С $_{ант}$ = 5 г/л (= 5 кг/м ^{3}); [6].
- c. Концентрація біомаси у КР С $_{БМ}$ = 4,6 г/л (= 4,6 кг/м ^{3}); [7].
- d. Втрати на стадіях виділення цільового продукту складають 38,0%:

початкова кількість цільового продукту, яка поступає з КР складає 3 м^3 ×5 кг/м^3 = 15 кг; кінцева кількість (з урахуванням 38 % втрат) має становити 9,3 кг.

Розподіл втрат по стадіях та підбір необхідного обладнання наведено у таблиці

Таблиця 5.2.

Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати, (Разом 40 %)	Вийшло	
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
ТП 1. Зберігання культуральної рідини						
1	ТП 1.1. Зберігання культуральної рідини	КР	3 $м^3$ (3000 л)	-	3 $м^3$ (3000 л)	Збірник КР 4$м^3$
ТП 2. Обробка капсул клітин бактерій						
2	ТП 2.1 Термічна обробка капсул клітин бактерій	КР	3 $м^3$ (3000 л)	-		Збірник КР 4$м^3$
		КР нагріта		-	3 $м^3$ (3000 л)	Збірник КР 4$м^3$
ТП 3. Відокремлення біомаси						
3	ТП 3.1. Сепарування	Біомаса	13,8 (3 ×4,6) – АСБ, з			На утилізацію

			урахуванням 90% вологості 138 кг	6,9 (5%)	131,1 кг	
		Фугат	(3-0,138)	-	2862 л	Сепаратор з продуктивність 100-400 л/год.
	ТП 4. Очищення цільового продукту (початок)					
5	ТП 5.1 Ультрафільтрація	Фугат	2862 л	-	-	Ультрафільтраційна установка. Діаметр пор мембрани – 0,45 мкм, продуктивність - 2,5 м3/год.
		Пермеат	-	-	(2862-90%) 286,2	
		Ультраконцентрат гіалуронової кислоти	-	(5%)	2575,8 л	
	ТП 5. Очищення цільового продукту					
6	ТП 6.1 Розбавлення очищеною водою ультраконцентрату ГК	Ультраконцентрат ГК	2575,8 л	-	-	Реактор змішувач 4 м^3
		Вода очищенна	286,2 л	-	-	
		ГК розбавлена	-	-	2862 л	
7	ТП 6.2. Адсорбція	ГК розбавлена	2862 л	-		

		Активоване вугілля	286,2	-		Реактор змішувач 4 м^3
		ГК очищена	-	(8%)	2633 л	
	ТП 6. Повторна ультрафільтарція					
8	ТП 7.1 Ультрафільтрація гіалуронової кислоти для видалення сорбенту	ГК очищена	2633 л	-	-	Ультрафільтраційна установка. Діаметр пор мембрани – 300 кДа, продуктивність - 2,5 м3/год
		Пермеат	-	-	-	
		Ультраконцентрат ГК	-	(5%)	12,45 кг	
	ТП 7. Утворення форми натрій гіалуронат					
9	ТП 8.1. утворення форми натрій гіалуронат	Ультраконцентрат ГК (вологість 40%)	12,45 кг	-	-	
		Натрій хлор 0,9%	1,28 кг	-	-	
		Натрій гіалуронат	-	(5%)	15,7 кг	
	ТП 8. Сушіння цільового продукту					

9	ТП 8.1. Сушіння Натрій гіалуронату у вакуумній сушарці	Натрій гіалуронат (вологість 40%)	15,7 кг	-	-	Вакуумна сушка продуктивністю 30 кг
		Висушений натрій гіалуронат(вологість 5%)	-	(4%)	10 кг	Піддони з ВСШ об'ємом по 14 кг
ТП 9. Подрібнення цільового продукту						
10	ТП 9.1. Подрібнення натрій гіалуронату сухого (сіль)	Висушений натрій гіалуронат (вологість 5%)	10 кг	-	-	Валова зубчаста дробарка
		Подрібнений натрій гіалуронату у вигляді порошку (вологість 5%)	-	(2%)	9,8 кг	Піддони з ВСШ об'ємом по 14 кг
ТП 10. Просіювання цільового продукту						
11	ТП 10.1. Просіювання натрій гіалуронату у вигляді порошку	Подрібнений натрій гіалуронат (вологість 5%)	9,8 кг	-	-	Вібраційне сито
		Просіяна маса (вологість 5%)	-	(2%)	9,6	Піддони з ВСШ об'ємом по 14 кг
ПМВ 11. Пакування, маркування, відвантаження						
12	ПМВ 11.1. Фасування, пакування, маркування солі	Просіяна маса (вологість 5%)	9,6	-	-	продуктивністю 45упаковок/цикл
		Упаковки по 50 г	-	(2%)	9,3 кг =47упаковок	

РОЗДІЛ 6

СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання забраженого на апаратурній схемі, наведена в *табл*. 6.1

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу ферменту інвертази

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
Н-22 Н-30 Н-36	Насос відцентровий	3	Насос відцентровий Debem MB 120. Продуктивність 25,0 м^3/год, матеріал поліпропілен (PP/PVDF). Виробник: «Debem» (Україна)[1]
Н-25 Н-33	Насос перестальтичний	2	Насос перистальтичний “Ragazzini SF 190”. Продуктивність при безперервній роботі - 18,6 м^3/год. Габаритні розміри (мм): висота - 1365; довжина - 1650; ширина - 820. Робочий тиск - до 1,5 МПа. Виробник: “Ragazzini”, Італія. [11]
ПЗ-1	Пристрій для забору повітря	1	Повітрозбірник А1И 019.000-01 Фірма: «НПЦ Вектор-Кондвент». Повітрозабірник, обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень[2]
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр G3. Фільтруючий матеріал – скловолокно, Площа фільтруючої поверхні 0,48 м^2, продуктивність 2800 м^3/год (0,78 м^3/с) Виробник: Компанія «Фармстрой», Росія[2]
К-3	Компресор	1	Компресор Inversys Plus з прямим приводом. Максимальний робочий тиск 1,0 МПа. Виробник: «Dalgakiran» (Туреччина)[3]
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Повітренагрівач канальний водяний Systemair VBR. Максимальний робочий тиск 1,6 МПа, при температурі води 100 ºС. Виробник: «Systemair» (Швеція)[3]
Р -5	Ресивер	1	Ресивер Р 270.600. Об’єм 270 л, робочий тиск 1,0 МПа. Виробник: «ДНТ-Прайм Группа компаний, ООО» (Росія)[4]

Продовження таблиці 6.1

Т-6	Теплообмінник нагрівач	1	Повітренагрівач канальний водяний Systemair VBR. Максимальний робочий тиск 1,6 МПа, при температурі води 100 ºС. Виробник: «Systemair» (Швеція)[3]
Ф-7	Головний фільтр очистки	1	Фільтр (Р)–GSL N. Фільтруючий матеріал – нержавіюча стальна сітка, швидкість фільтрування – 0,025 м/с, Е = 95 %. Виробник: «Donaldson» (США)[5]
ФІ-8 ФІ-14 ФІ-26 ФІ-30	Індивідуальний фільтр	3	Фільтр повітряний *Ultra depth II P-SRF*. Фільтруючий матеріал - боросилікат, діапазон температур від -20 до 200 °С, ступінь очищення повітря фільтром становить 99,999 %.. Виробник: «Donaldson» (США)[5]
Ін-9	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 6 л, оснащений сорочкою, барботером, трубою перетискування, пробовідбірником і лопатевою мішалкою (20-1500 об/хв), сталь AISI 304. Діаметр, м: 0,25, висота, м: 0,8 Виробник: «BIOSTAT® Cplus»[6]
Р-11	Реактор-змішувач для композиція А	1	Реактор-змішувач об'ємом 25 л, d = 250 мм, h = 400 мм оснащений сорочкою та турбінною мішалкою (100 об/хв), сталь AISI 316. Виробник компанія «BioTechno Group» (Росія)7.
З-13	Збірник для композиції Б	1	Реактор-змішувач об'ємом 45 л, d = 400 мм, h = 640 мм, оснащений сорочкою та турбінною мішалкою (100 об/хв), сталь AISI 316. Виробник компанія «BioTechno Group» (Росія)7
ДЗ-16 ДЗ -18 ДЗ-20 ДЗ-23 ДЗ-28 ДЗ-31	Об'ємно-ваговий дозатор		Ваговий дозатор сипучих матеріалів ВД-1. Продуктивність – 2400 доз/год. Об'єм накопичувального бункера – 240 л. Діапазон дозування – 2000 г. 1700*1200*2200. Виробник: «ПакТех», Україна[10]
Р-17	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації 6%- го розчину гідроксиду натрію	1	Реактор-змішувач об'ємом 10 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь 12Х18Н10Т. Діаметр, м: 1, висота, м: 0,5. Виробник: «Красный октябрь» (Україна)8.
З-19	Збірник для приготування 6%-го розчину соляної кислоти	1	Збірник об'ємом 10 л, оснащений перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь 12Х18Н10Т. Діаметр, м: 0,2, висота, м: 1. Виробник: «Красный октябрь» (Україна)8
Ін-15	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 100 л, оснащений сорочкою, барботером, трубою перетискування, пробовідбірником і турбінною мішалкою (50-800 об/хв), сталь 316. Діаметр, м: 0,5, висота, м: 1,5 L. Виробник «Biorus» (Росія)9

Р-21	Реактор-змішувач для композиції А	1	Реактор-змішувач об’ємом 400 л, d = 800 мм, h = 1 280 мм, оснащений сорочкою та турбінною мішалкою (100 об/хв), сталь AISI 316. Виробник компанія «BioTechno Group» (Росія)7.
З-24	Збірник для композиції Б	1	Реактор-змішувач об’ємом 630 л, d = 1 000 мм, h = 1 600 мм оснащений сорочкою та турбінною мішалкою (100 об/хв), сталь AISI 316. Виробник компанія «BioTechno Group» (Росія)7.
Ін-27	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 630 л, оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником і перемішуючим пристроєм (до 200 об/хв), сталь AISI 304L. Діаметр, м: 1, висота, м: 3 Виробник: «BioTechno Group» (Росія)7
З-32	Реактор-змішувач для композиції А	1	Збіник об’ємом 1,4 м3, d = 1 000 мм, h = 1 600 мм, оснащений сорочкою та турбінною мішалкою (100 об/хв), сталь AISI 316. Виробник компанія «BioTechno Group» (Росія).
Р-29	Збірник для композиції Б	1	Реактор-змішувач об’ємом 6м^3 d = 1800 мм, h =2300 мм оснащений сорочкою та турбінною мішалкою (100 об/хв), сталь L 316. Виробник компанія «Perry Videx» (Росія)10.
Ф-35	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 6300 л, оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником і перемішуючим пристроєм (до 200 об/хв), сталь AISI 304L. Діаметр, мм: 1600, висота, м: 7 Виробник: «BioTechno Group» (Росія)7
Н-36	Насом відцентровий для перекачування КР від ферментера Ф-35 у збірник З-37 для зберігання КР	1	Подача до 8 куб.м / год. Напір до 59 м. Застосовується для перекачування чистої води і хімічно неагресивних рідин без абразивних включень. Температура рідини - від -15 ºС до +70 0С. [13]
З-37	Збірник для зберігання КР	1	Збірник об’ємом 4 м3 з мішалкою та рубашкою [14]
Н-38	Насос відцентровий для перекачування розчину від З-37 у сепаратор С-39	1	Подача до 8 куб.м / год. Напір до 59 м. Застосовується для перекачування чистої води і хімічно неагресивних рідин без абразивних включень. Температура рідини - від -15 оС до +70 0С. [13]
С-39	Сепаратор	1	Продуктивність 100-400 л/ч Швидкість обертання ротора 6065об. / Хв. 1690×1520×1178мм ASME SA-240 S31603 (нерж. сталь)[15]

УФ-44	Ультрафільтраційна установка УОВ-ТП-2,5-014	1	Ультрафільтраційна установка “УОВ-ТП-2,5-014". Продуктивність по фільтрату - 2,5 $м^3$/год. Тиск фільтрату - 0,3 МПа. Потужність - 2,5 КВт. 1650*1250*620. Виробник: “Електроника”, Росія [16]
З-45	Збірник для проведення процесу адсорбції	1	Збірник об’ємом 4 м3 з мішалкою та рубашкою 14
УФ-50	Ультрафільтраційна установка МФ-801	1	2100х850х1790 Продуктивність 22.7 м3/год Тип мембрани BN 300 кДа З горизонтальними фільтрувальними елементами, яка складається зі збірника (З-46) обємом 3 м3, циркуляційний насос, (Н-47), попереднього фільтра (Ф-48) та фільтраційного модуля (УМ-49), продуктивність установки-10-30 м3/год. [17]
З-51	Збірник для утворення форми натрій гіалуронат за допомогою солі хлориду натрію	1	Збірник об’ємом 4 м3 з мішалкою та рубашкою [14]
ВСШ -52	Вакуумно – сушальна шафа СВ-30	1	Максимальна температура °С 200 Кількість полиць, шт 3 500×606×693мм Об’єм 33 л [18]
Др-53	Дробарка двухвалкова зубчаста ДДЗ-4	1	Продуктивність 20 – 100 кг Частоти, Гц 50 Потужність електродвигуна, кВт 11 2,55 * 2,4 * 0,925 Маса, т 4,02 [19]
Вб-54	Вібраційне сито BSST-600	1	Потужність (кг / год) 180-2000 Загальний розмір (мм) 800*800*1100 Екранна сітка 12-200 Частота вібрації (час / хв) 1500 Вага (кг)200 [20]
ФПА-55	Фасувальна машина «ПІТПАК»	1	Фасувально-пакувальний автомат 45 упаковок/цикл 1540*920*1556 [21]

Примітка*: пошук і підбір обладнання здійснювали з використанням наступних електронних джерел:

1. www.debem.com.ua («Debem», насоси)

2. http://www.dalgakiran.com.ua («Далгакиран компрессор Украина», обладнання для підготовки повітря)
3. http://www.dalgakiran.com.ua («Далгакиран компрессор Украина», обладнання для підготовки повітря)
4. https://resiver.all.biz/resiver-r-270600-270-litrov-10-bar-g3418704 («ДНТ-Прайм Группа компаний, ООО» ресивер)
5. - http://www.emea.donaldson.com («Donaldson» фільтри для повітря)
6. https://www.sartorius.com/download/122528/6/broch-biostat-a-sbi1518-r-data.pdf
7. https://prom.ua/p745429188-fermenter-bioreaktor-sartorius.html (ємнісне обладнання);
8. https://biotechno.ru/ (ємнісне обладнання для титруваьних розчинів);
9. http://bio-rus.ru/ (ємнісне обладнання);
10. https://pack-tech.com.ua/p936405033-vesovoj-dozator-sypuchih.html (ваговий дозатор для сипучих речовин);
11. https://promnasos.com/catalog/peristaltic_pumps/ragazzini/10085/ (насос перистальтичний, "Ragazzini" Італія);
12. https://perryvidex.eu/category/reactors/stainless-steel-reactor-europe-5-000-19-999-litres (Збірник для композиції Б)
13. https://nep.ua/tsentrobezhnyj-elektricheskij-nasos-s-odnim-rabochim-kolesom-cmp-230-400?gclid=CjwKCAjwqIiFBhAHEiwANg9sztC0nEGBZFd2PaX1AFiSNkJtD8X273uGCh6zkPtxly8P3A-r6PYOexoC4ZoQAvD_BwE
14. https://biotechno.ru/catalog/podgotovka-sred/yemkosti-dlya-khraneniya/ (збірник для зберігання КР)
15. https://bio-rus.ru/oborudovanie/protochnyie-czentrifugi/separatoryi-(alfa-laval)/alfa-laval-btax-215.html (сепаратор)
16. http://chemanalytica.com/book/novyy_spravochnik_khimika_i_tekhnologa/10_protsessy_i_apparaty_khimicheskikh_tekhnologiy_chast_II/7113 (УФ-установка "Електроника", Росія);
17. Ультрафільтраційна установкаУФ-801 https://biotechno.ru/catalog/vydelenie-i-ochistka-produkta1/sistema-dlya-mikro-i-ultrafiltratsii-uf-model-mf-801/; Насос циркуляційний TAIFU 25/40/130 https://nasos-online.com/ru/cirkylacionye-nasosi/nasos-tsirkulyatsionnyj-taifu-25-40-130/; Збірник об'ємом 3м3 під замовлення https://biotechno.ru/catalog/vydelenie-i-ochistka-produkta1/yemkosti-dlya-khraneniya/
18. https://prom.ua/p1082282114-shafa-sushilna-vakuumna.html?&primelead=MS4zMg (вакуумно-сушильна шафа)
19. https://zavodvityaz.com.ua/produkciya/drobilno-razmolnoe-oborudovanie/valkovye-drobilki
20. http://ua.powdermiller.com/sifting-machine/vibrating-sieve.html (зубчаста дробарка)
21. https://taurasfenix.com/oborudovanie/dly-afasovki-v-stiki-sashe/sachet-sap-400-p/ (Фасувально-пакувальна машина)

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема біосинтезу гіалуронової кислоти включає допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва, підготовка та стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу та біосинтез).

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

Обов'язковою частиною підготовчих робіт на біотехнологічних підприємствах є проведення робіт санітарно-гігієнічного спрямування. Основним спрямуванням санітарної підготовки виробництва є забезпечення мінімальної кількості контамінантів у всіх учасників виробничого процесу: в поживному середовищі, технологічному аераційному повітрі на поверхнях обладнання, яке контактує з культуральною рідиною, забезпечення чистоти на виробничих ділянках де чистота та асептика впливають на якісні показники продукції. Роботи санітарно-гігієнічного призначення суттєво впливають на створення безпечних умов праці і охороні здоров'я працівників підприємства. Санітарна підготовка виробництва реалізується виконанням робіт по щоденному позмінному та генеральному прибиранні виробничих приміщень і централізованою підготовкою обладнання.

ДР 1.1 Приготування миючих та дезинфікуючих засобів

Миючі та дезинфікуючі засоби, що використоуються в процесі виробництва мають бути зареєстрованими в держаному реєстрі миючих та дезинфікуючих засобів. Стерилізація апаратури та комунікацій провожиться методом термічної стерилізації під впливом насиченої водяної пари. Для миття внутрішніх частин обладнання, які забруднені органічними речовинами передбачене використання розчину каустичної соди.

ДР 1.1.1 Приготування розчину «Хлорантоїну» або «Дезекону»

Робочі розчини «Хлорантоїну» або «Дезекону» готують безпосередньо перед використанням у відрі, яке виготовлене з нержавіючої сталі.

Препарат у вигляді порошку вносять у ємність, додають воду та розчиняють при перемішуванні протягом 1–5 хв.

Для приготування робочих розчинів засобу використовують воду питну чи вторинну очищену. Допускається використовувати гарячу воду за температури (60±5)°С з метою прискорення розчинення засобу у воді.

ДР 1.1.2 Приготування розчину «Еклін-Н»

Робочий розчин «Еклін-Н» готують безпосередньо перед використанням у відрі, яке виготовлене з нержавіючої сталі.

Препарат у вигляді порошку вносять у ємність, додають воду та розчиняють при перемішуванні протягом 1–5 хв.

Для приготування робочих розчинів засобу використовують воду питну чи вторинну очищену. Допускається використовувати гарячу воду за температури (60±5)°С з метою прискорення розчинення засобу у воді.

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря здійснюється через повітрозабірник (ПЗ-1), який розташований на висоті 10 м.

ДР 2.2. Очищення повітря від пилу та механічних часток.

Попередню очистку повітря здійснюють у фільтрі (Ф-2), що забезпечує ступінь очищення 75-80%. При проходженні повітря через фільтр грубого очищення, пил, механічні частки діаметром 5–10 мкм затримуються, знижується кількість контамінантів.

ДР 2.3. Стиснення повітря

Для подолання гідравлічного тиску стовпа рідини в ферментері, інших опорів, а також для потреб виробництва, повітря необхідно стиснути.

При стисканні повітря у компресорі (К-3), його температура підвищується з 15-25 ºС на вході до 120-150ºС на виході з нього і в результаті знищується значна кількість контамінуючої мікрофлори.

Після компресора (К-3) повітря має тиск P = 0,4 МПа, та температуру t = 120-150ºС.

ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Для видалення вологи, що утворилася при компресуванні, повітря піддають швидкому охолодженню до 19 ºС у теплообмінному апараті (Т-4), далі видалену вологу подають на ресивер (Р-5), у якому відбувається видалення зайвої вологи до W = 60 %.

ДР 2.5. Підігрів повітря

Для запобігання конденсації пари на волокнах головного та індивідуальних фільтрів охолоджене повітря підігрівають до 30-35 ºС за допомогою повітронагрівача (Т-6).

ДР 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Повітря пропускають через головний фільтр (Ф-7), для очищення повітря від мікроорганізмів. Ступінь очищення становить Е = 95 %.

ДР 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Перед кожним апаратом встановлюють індивідуальний фільтр (Ф-8, Ф-14, Ф-22, Ф-30), для повного завершення очистки повітря. Ступінь очищення становить Е = 99,999 %.

ДР 3. Приготування та стерилізація титрувальних агентів

ДР 3.1 Приготування 6% розчину HCl

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування розчинів 6 %–ї HCl для підкислення поживних середовищ наведений у табл. 7.1.

Таблиця 7.1

Розрахунок кількості 36 %–го розчину HCl і води питної для приготування 6 %–го розчину HCl для підкислення солей

Об'єм розчину солей, який необхідно підкислити, л	Об'єм 6 %– го розчину HCl для підкислення, мл	Тара, в якій готується і зберігається 6 %– й розчин HCl	Об'єм 36 %–го розчину HCl, мл	Об'єм води питної, мл
20	**40**	**Колба на 100 мл**	**12**	**28**
200	**400**	**Колба на 1 л**	**120**	**280**
2000	**4000**	**Колба на 10 л**	**1200**	**2800**

ДР 3.1.1 Приготування розчину HCl для підкислення солей, використовуваних для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 60 л.

Для приготування 40 мл 6%-го розчину HCl в колбу об'ємом 100 мл вносять 28 мл стерильної дистильованої води. Далі додають при постійному перемішуванні та охолодженні 12 мл 36%-ї HCl. Рідини обов'язково змішують в такому порядку, з метою для кращого перемішування. Приготований 6 %–й розчин HCl не стерилізують.

ДР 3.1.2 Приготування розчину HCl для підкислення солей, використовуваних для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 0,63 м³.

Для приготування 400 мл 6%-го розчину HCl в колбу об'ємом 1 л вносять 280 мл стерильної дистильованої води. Далі додають при постійному перемішуванні та охолодженні 120 мл 36%-ї HCl. Рідини обов'язково змішують в такому порядку, з метою для кращого перемішування. Приготований 6 %–й розчин HCl не стерилізують.

ДР 3.1.3 Приготування розчину HCl для підкислення солей, використовуваних для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 6,3м³.

Для приготування 4000 мл 6%-го розчину HCl в збірник (З-19) об'ємом 10 л вносять 2800 мл стерильної дистильованої води. Далі додають за допомогою вагового дозатора (ДЗ-18) при постійному перемішуванні та охолодженні 1200 мл 36%-ї HCl. Рідини обов'язково змішують в такому порядку, з метою для кращого перемішування. Приготований 6 %–й розчин HCl не стерилізують. Розчин соляної кислоти подають самопливом до інокулятора (Ін-27) об'ємом 6,3м^3.

ДР 3.2 Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування розчинів 6 %–ї KOH наведений у табл. 7.2

Таблиця 7.2

Розрахунок кількості гідроксиду натрію і води питної для приготування 6 %–го розчину гідроксиду натрію для підлужнення середовища

Об'єм розчину солей, який	Об'єм 6 %– го розчину NaOH	Тара, в якій готується і	Маса їдкого натру, г	Об'єм води питної, мл

необхідно підкислити, л	для підкислення, мл	зберігається 6 %– й розчин HCl		
20	**40**	**Колба на 100 мл**	**4,6**	**35,4**
200	**400**	**Колба на 1 л**	**46**	**354**
2000	**4000**	**Колба на 10 л**	**460**	**3540**

ДР 3.2.1 Приготування розчину NaOH для підлужнення середовища, в інокуляторі об'ємом 60 л.

На технічних вагах зважують 4,6 г кристалічного NaOH. Наважку переносять у колбу об'ємом 100 мл, додають 35,4 мл дистильованої води і перемішують до повного розчинення кристалів (див. табл. 4.2). Закривають колбу ватно - марлевою пробкою та стерилізують при 131ºС впродовж 40 хв (0,15 МПа).

ДР 3.2.2 Приготування розчину NaOH для підлужнення середовища, в інокуляторі об'ємом 0,63м³.

На технічних вагах зважують 46 г кристалічного NaOH. Наважку переносять у колбу об'ємом 1 л, додають 354 мл дистильованої води і перемішують до повного розчинення кристалів (див. табл. 4.2). Закривають колбу ватно - марлевою пробкою та стерилізують при 131ºС впродовж 40 хв (0,15 МПа).

ДР 3.2.3 Приготування розчину NaOH для підлужнення середовища, в інокуляторі об'ємом 6,3м³.

У реактор (Р-17) за допомгою об'ємно – вагового дозатора (Д-16) вносять 460 г кристалічного NaOH. Далі додають 3540 мл дистильованої води і перемішують до повного розчинення кристалів (див. табл. 4.2). Стерилізують при 131ºС впродовж 40 хв (0,15 МПа). Готовий розчин гідроксиду натрія подають самопливом до ферментера (Ф-35) об'ємом 6,3 м^3.

ДР 4. ***Приготування та стерилізація поживних середовищ.***

ДР 4.1 *Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках.*

Розрахунок вмісту необхідних компонентів для приготування середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках на 1 л наведений у табл. 7.3.

Таблиця 7.3

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 1 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Сахароза	20	20	А	100
Гідролізат казеїну	25	25		
Дріжджовий екстракт	3,5	3,5		
NaCl	1,5	1,5	Б	200
K_2HPO_4	2,0	2		
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,4	0,4	В	60

ДР 4.1.1*.Приготування та стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 20 г сахарози, 25 г гідролізат казеїну, 3,5 г дріжджового екстракту. Наважку поміщають у колбу об'ємом 1 л додають 100 мл дистильованої води і перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С упродовж 20 хв.

ДР 4.1.2. *Приготування і стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують 1,5 г NaCl, 2 г K_2HPO_4. Наважку поміщають у колбу об'ємом 2 л, додають 200 мл дистильованої води і перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 4.1.3. *Приготування та стерилізація композиції В*

На технічних вагах зважують 0,4 г $MgSO_4 \times 7H_2O$. Наважку переносять у колбу об'ємом 250 мл, додають 60 мл дистильованої води і перемішують.

Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 4.2 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування в інокуляторі об'ємом 5 л.

Таблиця 7.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 3,53 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 4,5 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Сахароза	20	90	А	1
Гідролізат казеїну	25	112,5		
Дріжджовий екстракт	3,5	15,75		
NaCl	1,5	6,75	Б	2
K_2HPO_4	2	9		
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,4	1,8	В	0,53

ДР 4.2.1 *Приготування та стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 90 г сахарози, 112,5 г гідролізат казеїну, і 15,75 г дріжджового екстракту. Наважку поміщають у колбу об'ємом 1 л додають 1 л питної води і перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С упродовж 30 хв.

ДР 4.2.2 *Приготування і стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують 6,75 г NaCl, 9 г K_2HPO_4. Наважку поміщають у колбу об'ємом 5 л, додають 2 л питної води і перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 4.2.3 *Приготування та стерилізація композиції В*

На технічних вагах зважують 1,8 г $MgSO_4 \times 7H_2O$. Додають 530 мл дистильованої води і перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 4.3 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляту об'ємом 60 л.

Таблиця 7.5

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 35,4 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 50,45 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Сахароза	20	1009	А	15,4
Гідролізат казеїну	25	1261		
Дріжджовий екстракт	3,5	176		
NaCl	1,5	77	Б	20
K_2HPO_4	2	101		
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,4	20,18		
Вода		40,86		

ДР 4.3.1. *Приготування та стерилізація композиції А*

У реактор-змішувач (Р-11) об'ємом 25 л за допомогою об'ємно – вагового дозатора (Д-10) вносять 1009 г сахарози, 1261 г гідролізат казеїну, 176 дріжджового екстракту, додають питну воду до загального об'єму 15,4 л. Встановлюють режим перемішування 100 об/хв для розчинення. Отриманий розчин стерилізують гострою парою при температурі 112 °С упродовж 30 хв.

ДР 4.3.2 *Приготування і стерилізація композиції Б*

За допомогою об'ємно – вагового дозатора (Д-12) у збірник (З-13) об'ємом 45 л вносять наважки таких солей: 77 г NaCl, 101 г K_2HPO_4 та 20,18 г $MgSO_4 \times 7H_2O$, додають питну воду до загального об'єму 20 л. Для кращого розчинення

солей в сорочку подається пара. Встановлюють режим перемішування з кількістю обертів 150 об/хв до повного розчинення солей. Розчин подають в попередньо простерилізований інокулятор об'ємом 100 л. Для запобігання утворенню нерозчинних фосфатів магнію pH розчину з солями, доводять до значення 4-4,5 6 %-вим розчином соляної кислоти (від *ДР 3.1.1*). На 20 літрів піде 40 мл соляної кислоти – розчин такого об'єму можна приготувати у колбі. Стерилізація солей відбувається при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 4.4 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в ферментері об'ємом 0,63 м³

Таблиця 7.6

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 342 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 500 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Сахароза	20	10000	А	142
Гідролізат казеїну	25	12500		
Дріжджовий екстракт	3,5	1750		
NaCl	1,5	750	Б	200
K_2HPO_4	2	1000		
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,4	200		
Вода		405		

***ДР 4.4.1** Приготування та стерилізація композиції А*

У реактор-змішувач (Р-21) об'ємом 400 л за допомогою об'ємно – вагового дозатора (Д-20) вносять 10000 г сахарози і 12500 г гідролізат казеїну, 1750 г дріжджового екстракту, додають питну воду до загального об'єму 142 л. Встановлюють режим перемішування 150 об/хв для розчинення. Отриманий розчин стерилізують гострою парою при температурі 112 °С упродовж 30 хв.

ДР 4.4.2 *Приготування і стерилізація композиції Б*

За допомогою об'ємно – вагового дозатора (ДЗ-23) у збірник (З-24) об'ємом 630 л вносять наважки таких солей: 750 г NaCl, 1000 г K_2HPO_4 та 200 г $MgSO_4 \times 7H_2O$, додають питну воду до загального об'єму 200 л, перемішують. Для кращого розчинення солей в сорочку подається гостра пара. Встановлюють режим перемішування з кількістю обертів 150 об/хв до повного розчинення солей. Розчин подають в попередньо простерилізований посівний апарат об'ємом 1,25 $м^3$. Для запобігання утворенню нерозчинних фосфатів магнію pH розчину з солями, доводять до значення 4-4,5 6 %-вим розчином соляної кислоти (від *ДР 3.1.2*). На 200 літрів піде 400 мл соляної кислоти – розчин такого об'єму можна приготувати у колбі. Стерилізація солей відбувається при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 4.5 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в ферментері об'ємом 6,3 $м^3$

Таблиця 7.7

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 3,32$м^3$ середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 5000 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Сахароза	20	100000	А	1320
Гідролізат казеїну	25	125000		
Дріжджовий екстракт	3,5	17500		
NaCl	1,5	7500	Б	2000
K_2HPO_4	2	10000		
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,4	2000		
Вода		4050		

ДР 4.5.1 *Приготування та стерилізація композиції А*

У реактор-змішувач (Р-29) об’ємом 4000 л за допомогою об’ємно – вагового дозатора (ДЗ-28) вносять 100000 г сахарози і 125000 г гідролізат казеїну, 17500 г дріжджового екстракту, додають питну воду до загального об’єму 1320 л. Встановлюють режим перемішування 150 об/хв для розчинення. Отриманий розчин стерилізують гострою парою при температурі 112 °С упродовж 30 хв.

ДР 4.5.2 *Приготування і стерилізація композиції Б*

За допомогою об’ємно – вагового дозатора (ДЗ-31) у збірник (З-32) об’ємом 6300 л вносять наважки таких солей: 7500 г NaCl, 1000 г K_2HPO_4 та 2000 г $MgSO_4 \times 7H_2O$, додають питну воду до загального об’єму 2000 л, перемішують. Для кращого розчинення солей в сорочку подається гостра пара. Встановлюють режим перемішування з кількістю обертів 150 об/хв до повного розчинення солей. Розчин подають в попередньо простерилізований посівний апарат об’ємом 6,3 $м^3$. Для запобігання утворенню нерозчинних фосфатів магнію pH розчину з солями, доводять до значення 4-4,5 6 %-вим розчином соляної кислоти (від *ДР 3.1.3*). На 2000 літрів піде 4000 мл соляної кислоти – розчин такого об’єму можна приготувати у колбі. Стерилізація солей відбувається при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу.

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Культуру мікроорганізму *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 зберігають у пробірках на агаризованому середовищі THY, при температурі 4 ^oC. Пересіви культури здійснюються кожні 3-4 місяці, в асептичних умовах.

ТП 5.2. Одержання робочої культури на агаризованому середовищі.

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках зі скошеним агаром THY, пересівають петлею на чашки Петрі із середовищем того ж складу і вирощують 24 год. у термостаті за температури 37 °С для отримання ізольованих колоній. Через 24 години роблять пересів із чашки Петрі на пробірки зі скошеним THY і вирощують при температурі 37 °С протягом 24 год.

ТП 5.3. *Вирощування робочої культури на агаризованому середовищі.*

З чашки Петрі роблять пересів ізольованих колоній на пробірки з ТНУ. Культивують в термостаті при температурі 37 ºС протягом 24 год.

ТП 5.4. *Вирощування культури в колбах на качалках*

Для вирощування посівного матеріалу у колбу об'ємом 2 л з 100 мл розчину композиції А (від *ДР 4.1.1*) в асептичних умовах вносять 200 мл розчину композиції Б (від *ДР 4.1.2*), 60 мл розчину композиції В (від *ДР 4.1.3*). Перемішують і розливають по 150 мл у 3 стерильні колби.

У пробірку з робочою культурою *Streptococcus zooepidemicus* АТСС 39920, вирощеного на ТНУ, вносять 2 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і переносять у колби з розлитим поживним середовищем. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з однієї пробірки. Бактерії вирощують у колбах на качалці (200 об/хв) упродовж 24 годин.

Кожні 4 год відбирають пробу культуральної рідини для мікробіологічного контролю. Після вирощування бактерій у колбах на качалці, культуральну рідину з колб переносять у стерильну засівну колбу об'ємом 2 л.

ТП 5.5. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 5 л

Для вирощування інокуляту у попередньо простерилізований інокулятор (Ін-9) об'ємом 6 л в асептичних умовах вносять 1,0 л розчину композиції А (*від ДР 4.2.1*), 2,0 л розчину композиції Б (*від ДР 4.2*.2), 0,53 л розчину композиції В (*від ДР 4.2.3*), і посівний матеріал (через засівну колбу від *ТП 5.4*). Температура культивування 37 °С при рН 7, перемішування відбувається при подачі аераційного повітря (швидкість перемішування – 200 об/хв.), витрати повітря 2л/л·хв. Тривалість культивування становить 28 год. Періодично (кожні 4 год) відбирають пробу культуральної рідини для мікробіологічного контролю .

ТП 5.6. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 60 л

Для вирощування інокуляту у попередньо простерилізований інокулятор (Ін-15) об'ємом 60 л в асептичних умовах вносять 15,4 л розчину композиції А (від *ДР 4.3.1*), 20 л розчину композиції Б (від *ДР 4.3.2*), посівний матеріал (через

трубку перетискування від *ТП 5.5*). Оптимальне значення pH для росту продуцента становить 7. Тому для того, щоб його вирівняти вносимо розчин NaOH (40 мл) (від *ДР 3.2.1)* Температура культивування 37 °С, швидкості перемішування 200 об/хв, витрати повітря 2 л/л·хв. Тривалість культивування становить 28 год. Періодично (кожні 4 год) відбирають пробу культуральної рідини для мікробіологічного контролю та визначення концетрації ГК.

ТП 5.7 Вирощування культури у малому ферментері об'ємом 0,63 м³.

У попередньо простерилізований інокулятор (Ін-27) об'ємом 0,63 м^3 в асептичних умовах перекачують 142 л розчину композиції А (від *ДР 4.4.1*), 200 л розчину композиції Б (від *ДР 4.4.2*). Вмикають перемішуючий пристрій і доводять 6 %–м розчином NaOH (*від ДР 3.2.2*) pH середовища до 7,0. Через трубу перетискування перекачують з інокулятора (*від ТП 5.6*) інокулят. Температура культивування 37 °С, перемішування відбувається турбінною мішалкою при швидкості перемішування 150 об/хв, витрати повітря 2 л/л·хв. Тривалість культивування становить 28 год. Культивують до концентрації гіалуронової кислоти 5 г/л та концентрації біомаси Х=4,66 г/л відповідно при температурі 37ºС з частотою обертів перемішуючого пристрою 200 об/хв впродовж 28 год. Періодично (кожні 4 год) відбирають пробу культуральної рідини для мікробіологічного контролю.

ТП 6. Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 6,3 м³.

У попередньо простерилізований ферментер (Ф-35) об'ємом 6,3 м^3 в асептичних умовах перекачують 1320 л розчину композиції А (від *ДР 4.5.1*), 2000 л розчину композиції Б (від *ДР 4.5.2*). Вмикають перемішуючий пристрій і доводять 6 %–м розчином NaOH (*від ДР 3.2.3*) pH середовища до 7,0. Через трубу перетискування перекачують з інокулятора (*від ТП 5.7*) інокулят. Температура культивування 37 °С, перемішування відбувається турбінною мішалкою при швидкості перемішування 150 об/хв, витрати повітря 2 л/л·хв. Тривалість культивування становить 28 год. Культивують до концентрації гіалуронової кислоти 5 г/л та концентрації біомаси Х=4,66 г/л відповідно при температурі 37 ºС з частотою обертів перемішуючого пристрою 200 об/хв

впродовж 28 год. Періодично (кожні 4 год) відбирають пробу культуральної рідини для мікробіологічного контролю.

ТП 7. Зберігання культуральної рідини

ТП 7.1. Зберігання культуральної рідини

Культуральна рідина об'ємом 3 $м^3$ перекачують за допомогою відцентрового насоса (Н-36)зберігається після процесу біосинтезу у збірнику (З-37) при температурі 20 ° С та pH 7,0.

ТП 8. Термічна обробка капсул клітин бактерій

ТП 8.1. Термічна обробка капсул клітин бактерій

Культуральну рідину об'ємом 3 $м^3$ нагрівають до температури 70 ° С при pH 7,0 на 1 годину. Далі культуральну рідину об'ємом 3 $м^3$ витримують при температурі 25 ° С ще 5 годин.

ТП 9. Відділення біомаси.

ТП 9.1. Сепарування

Культуральну рідину об'ємом 3 $м^3$ (від ТП 8.1) по трубопроводам за допомогою відцентрового насосу (Н-38) направляється зі збірника (З-37) на сепаратор (С-39) продуктивністю 3000л/год для проведення процесу відокремлення біомаси. На виході маємо фугат об'ємом 2862 л, біомасу 131,1 кг відправляємо на утилізацію.

ТП 10. Очищення цільового продукту.

ТП 10.1 Ультрафільтрація

Фільтрат гіалуронової кислоти об'ємом 2862 л із сепаратора (С-39-5) за допомогою відцентрового насоса (Н-40) подається на ультрафільтраційну установку (УФ-45). Далі за допомогою циркуляційного насоса (Н-42) через фільтр попередньої очистки (Ф-43) подається на фільтраційний модуль (УМ-44), де протягом години при температурі 25 °С здійснюється фільтрація на мембранах з діаметром пор 0,45 мкм.

Для запобігання забивання пор мембрани осадами передбачено використовувати циркуляційний насос, що забезпечує лінійну швидкість потоку рідини через мембрану близько 2–5 м/с. При таких швидкостях спостерігається значний гідравлічний опір.

По закінченню процесу, отримуємо ультраконцентрат об’ємом 2575,8 л.

ТП 11. Очищення цільового продукту.

ТП 11.1 Розбавлення очищенною водою ультраконцентрат ГК

Ультраконцентрат об’ємом 2575,8 л (від ТП 9.1) перекачується до реактора – змішувача (Р-46). Далі ультраконцентрат розбавляється очищеною водою об’ємом 286,2 л для отримання такого ж об’єму (2862 л) як до процесу ультрафільтрації.

ТП 12. Адсорбція

ТП 12.1 Адсорбція гіалуронової кислоти

Після цього, до розбавленого розчину гіалуронової кислоти додається сорбент – активоване вугілля у кількості 286,2 л. Далі розчин гіалуронової кислоти, що містить активоване вугілля відстоюють протягом 1 години. Сорбент здатний добре поглинати високомолекулярні білки, що можуть міститися в розчині.

ТП 13. Ультрафільтрація

ТП 13.1.Ультрафільтрація ГК від активованого вугілля

Адсорбований розчин гіалуронової кислоти від (ТП 12.1) об’ємом 2633 л із реактора (Р-46) за допомогою циркуляційного насоса (Н-49) через фільтр попередньої очистки (Ф-50) подається на фільтраційний модуль (УМ-51), де протягом години при температурі 25 ºС здійснюється фільтрація на мембранах з діаметром пор 300 кДа. На виході маємо 12,45 кг ультраконцентрату.

ТП 14. Утворення нової форми за допомогою солі хлориду натрію

ТП 14.1 Утворення форми натрій гіалуронат

Ультраконцентрат гіалуронової кислоти об’ємом 12,45 кг (від ТП 13.1) перекачують за допомогою відцентрового насоса (Н-52) до збірника (3-53). Далі додають 0,15 М хлорид натрію у кількості 1,28 л. Температура становить 25 ºС при pH 7,0. В результаті реакції заміщення утворюється 15,7 кг розчину натрій гіалуронату.

ТП 15. Сушіння цільового продукту.

ТП 15.1. Сушіння натрій гіалуронату у вакуумній сушарці. Сіль натрій гіалуронату у кількості 15,7 кг (від ТП 14.1) вручну на піддонах переносять у ваууумну сушильну шафу (ВСШ-54) продуктивність 30 кг/цикл. Сіль натрій гіалуронат висушують до 5% вологості (10,0 кг). Сушіння триває 8 год при температурі 60°С.

ТП 16. Подрібнення цільового продукту

ТП 16.1. Подрібнення натрій гіалуронату сухого. Суху субстанцію у вигляді коржів натрій гіалуронату знімаємо з піддонів (від ТП 15.1) та поміщаємо до валової дробарки, щоб надалі отримати вже готову форму у вигляді порошку білого кольору. Конструкція таких агрегатів складається з 2-х зубчастих валків. Дроблення здійснюється за рахунок попадання сировини між ними. Розмір частинок на виході регулюється за допомогою зміни величини зазору між валками. Подрібнення проходить до 1 години. По закінченню отримуємо порошок білого кольору у кількості 9,8 кг, який треба просіяти. Розміри подрібненої солі становить 10 мкм.

ТП 17. Просіювання цільового продукту.

ТП 17.1. Просіювання натрій гіалуронату у вигляді порошку.

Подрібнений порошок натрій гіалуронату відправляють на піддонах (від ТП 16.1) на вібраційне сито (ВС-56) для того, щоб здійснити відсів невеликого відсотка солі, що може містити різний розмірів. Процес триває 30 хвилин. По закінченню отримуємо 9,6 кг натрій гіалуронату у формі порошку білого кольору.

ПМВ 18. Пакування, маркування, відвантаження.

Фасування порошку натрій гіалуронат здійснюють у фасувальній машині (ФПА-57) марки «ПІТПАК». У фіналі маємо 9,3 кг розфасовані по 200 г у кожний пакет.

Сіль натрій гіалуроната повинна зберігатися у сухому, темному місці при температурі 25 ° С. Упаковка повинна забезпечити вологонепроникність солі.

Для ефективного зберігання солі проводиться фасування по 0,2 кг у кожний пакет.

Вертикальний фасувально-пакувальний автомат «ПІТПАК» призначений для упаковки широкого асортименту сипучих, гранульованих, дрібноштучних, заморожених продуктів в трьохшовні пакети, що формуються з рулонного термозварювального матеріалу.

Трьохшовний пакет-подушка - запаяний з трьох сторін пакет, який отримав широке поширення серед виробників солі.

Автомат є базовим в лінійці вертикальних пакувальних машин і відрізняється компактними розмірами і прийнятною ціною при рівні продуктивності до 45 циклів / хв.

Матеріал упаковок виготовляється: поліетілен, поліпропілени, ламінати, бар'єрні плівки, морозостійкі плівки.

Отже, сіль фасується у трьохшовний пакет-подушка (*Рис. 7.1*).

Рис. 7.1. Пакет з плоским дном

Процес маркування включає такі позначення:

- Назва виробника
- найменування продукту «натрій гіалуронат»
- масу нетто;
- номер партії;
- дату виготовлення;

ЗВ 19. Знешкодження відходів

ЗВ 19.1. Знешкодження рідких відходів

Рідкі відходи *(від ДР 1.1.1., ДР 1.1.2.)* збирають у каналізаційний колектор, відправляючи на біотенки. Рідкі відходи проходять через спеціальний фільтрувальну мембрану, очищаються створюваною біологічною плівкою. Після цього, забруднені відходи залишають в біофільтрі нерозчинні домішки, колоїдні, а також розчинені органічні речовини, які здійснюють сорбцію біологічною плівкою.

ЗВ 19.2 Знешкодження твердих відходів

Пластикову тару для мийних засобів та упаковки компонентів поживних середовищ сортують та відправляють на повторну переробку до пуктів прийому вторсировини.

ЗВ 19.3 Знешкодження газоподібних відходів

Знешкодження газоподібних відходів (*від ТП 5.1, ТП 14.1)* здійснюють за допомогою біоскруберів.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

8.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів

Під час промислового виробництва гіалуронової кислоти здійснюють контроль підготовки аераційного повітря, підготовку титрувальних агентів, роблять періодичні відбори проб для мікробіологічного контролю поживних середовищ, посівного матеріалу, культуральної рідини під час біосинтезу, а також для контролю показників росту і біосинтезу: концентрації гіалуронової кислоти, концентрацію біомаси, визначення концентрації компонентів джерела вуглецю та концентрація джерела азотного живлення.

Карта постадійного контроля представлена в таблиці 8.1.

ДР 1. Підготовка миючих та дезенфікуючих засобів				
$К_х$1.1.1 Приготування робочого розчину Хлорантоїну або Дезекону	Концентрація розчину Хлорантоїну або Дезекону	Хімічний метод, Термометр технічний	Після приготування розчинів	С = 0,20 %
$К_х$1.1.2 Приготування робочого розчину Еклін – Н	Концентрація розчину Еклін – Н	Хімічний метод, Термометр технічний	Після приготування розчинів	С = 0,20 %
ДР 2. Підготовка аераційного повітря				
$К_т$ 1.2 Попередня груба фільтрація	Повітря на виході з фільтра, ступінь чистоти	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	Е = 75%
$К_т$1.3 Подача повітря в компресор	Температура, тиск стиснення повітря	Манометр технічний, термометр технічний	Після компресування повітря	р = 0,4 Мпа, t = 120-150 ºС
$К_т$1.4 Охолодження повітря та видалення вологи	Охолоджене повітря, температура, вологість повітря	Термометр технічний, психомет-ричний метод	Після охолодження повітря та видалення зайвої вологи	t = 30ºС, W=60%
$К_т$1.5 Нагрівання повітря	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	t = 35-37ºС,
$К_т$1.6 Тонка фільтрація повітря	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспор	Після очистки повітря у фільтрі головного очищення	Е = 95 %, тиск згідно паспорту
Кт 1.7 Очищення повітря на індивідуальних фільтрах	Очищене повітря, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря в індивідуальному фільтрі	Е = 99,995 %
ДР 3.Підготовка титрувальних агентів				
ДР 3.1 Приготування 6%-го розчину соляної кислоти				
Кх 3.1.1 Приготування розчину соляної	Концентрація розчину HCl	Хімічний метод	Концентрація визначається після приготування розчину	С = 6%

кислоти для підкислення середовища в інокуляторі об'ємом 60 л				
Кх 3.1.2 Приготування розчину соляної кислоти для підкислення середовища в ферментері об'ємом 0,63 м^3	Концентрація розчину HCl	Хімічний метод	Тиск визначається під час стерилізації,мікрологічний контроль після стерилізації	С = 6%
Кх 3.1.3 Приготування розчину соляної кислоти для підкислення середовища в інокуляторі об'ємом 6,3м^3	Концентрація розчину HCl	Хімічний метод	Тиск визначається під час стерилізації,мікрологічний контроль після стерилізації	С = 6%
ДР 3.2. Приготування та стерилізація 6%-го розчину гідроксиду натрію				
Кх, Км, Кт 3.2.1 Приготування і стерилізація розчину NaOH для підлужнення середовища, для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 60 л	Температура стерилізації, час стерилізації, стерильність, концентрація розчину NaOH	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль, хімічний метод	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний і хімічний контроль після стерилізації	t = 131 ºС, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти, С = 6 %
Кх, Км,Кт 3.2.2 Приготування і стерилізація розчину NaOH для підлужнення середовища, для біосинтезу в ферментері об'ємом 0,63 м3	Температура стерилізації, час стерилізації, стерильність, концентрація розчину NaOH	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль, хімічний метод	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний і хімічний контроль після стерилізації	t = 131 ºС, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти, С = 6 %
Кх, Км,Кт 3.2.3 Приготування і стерилізація розчину NaOH для підлужнення середовища, для біосинтезу в ферментері об'ємом 6,3 м3	Температура стерилізації, час стерилізації, стерильність, концентрація розчину NaOH	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль, хімічний метод	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний і хімічний контроль після стерилізації	t = 131 ºС, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти, С = 6 %
ДР 4 Приготування та стерилізація поживних середовищ				
ДР 4.1 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування				

інокуляту в колбах на качалці				
Кт,Км 4.1.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	pH–метр, манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	pH=7,0 P=0,05 МПа, t=112 оС, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт,Км 4.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації,мікрологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=131 оС, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт,Км 4.1.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, тиск, стерильність	Манометр, термометр, технічний годинник, м/б контроль	Тиск визначається під час стерилізації,мікрологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=131 оС, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
ДР 4.2 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 6 л				
1	2	3	4	5
Кт,Км 4.2.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	pH–метр, манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	pH=7,0 P=0,05 МПа, t=112 оС, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт,Км 4.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації,мікрологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=131 оС, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
$К_{т,}$ $К_{м}$ 4.2.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації,мікрологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=131 оС, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
ДР 4.3 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 60 л				
Кт,Км 4.3.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	pH–метр, манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	pH=7,0 P=0,05 МПа, t=112 оС, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт,Км 4.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	pH–метр, манометр технічний, годинник,	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний	pH=4-4,5 P=0,15 МПа, t=131 оС, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти

		мікробіологічний контроль	контроль після стерилізації	
ДР 4.4 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 0,63 м3				
Кт,Км 4.4.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	pH–метр, манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	pH=7,0 P=0,05 МПа, t=112 оС, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт,Км 4.4.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	pH–метр, манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	pH=4-4,5 P=0,15 МПа, t=131 оС, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
ДР 4.5 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 6,3м3				
Кт,Км 4.5.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	pH–метр, манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	pH=7,0 P=0,05 МПа, t=112 оС, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт,Км 4.5.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	pH–метр, манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	pH=4-4,5 P=0,15 МПа, t=131 оС, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
ТП 5. Підготовка посівного матеріалу				
$К_т$ 5.1 Зберігання музейної культури	Температура	Термометр	Температура контролюється впродовж усього зберігання культури	t = 4 °C
$К_т$, $К_м$ 5.2 Одержання робочої культури	Час, температура, посівний матеріал	Термометр технічний, годинник, м/б контроль	Температура контролюється впродовж усього культивування	t = 37 °C τ = 24 год. відсутність сторонньої мікробіоти

$К_т, К_м$ 5.3 Вирощування робочої культури на агаризованому середовищі	Робоча культура *Streptococcus zooepidemicus* АТСС 39920 тривалість культивування, температура, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура контролюється впродовж усього культивування	t = 37 °С τ = 24 год. відсутність сторонньої мікробіоти
$К_т, К_м$ 5.4 Вирощування культури в колбах	Посівний матеріал, pH тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури, аерація	pH–метр Термометр технічний, годинник, м/б контроль, киснемір швидкість перемішуваня тахометр, фотоелектроколориметр	pH визначається перед культивуванням. Тривалість, температура визначається під час вирощування, м/б контроль і конц.біомаси після стерилізації	pH= 7 t = 37 °С, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти, $С_{кисню}$ = 0. w = 200 об/хв,
$К_т, К_м$ 5.5 Вирощування культури в малому інокуляторі об'ємом 6 л	Посівний матеріал, pH температура, час, м/б чистота	pH–метр Термометр технічний, годинник, м/б контроль швидкість перемішуваня тахометр, фотоелектроколориметр	pH визначається перед культивуванням. Тривалість, температура визначається під час вирощування, м/б контроль і конц.біомаси після стерилізації проби КР для м/б контролю кожні 6 год.	pH =7 t = 37 °С, τ = 28 год, відсутність сторонньої мікробіоти, w = 200 об/хв,
$К_т, К_м$ 5.6 Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 60 л	Посівний матеріал, pH, температура час, м/б чистота	Термометр технічний, годинник, м/б контроль, швидкість перемішуваня тахометр, фотоелектроколориметр	pH визначається перед культивуванням. Тривалість, температура, визначається під час вирощування, м/б контроль і конц.біомаси після стерилізації проби КР для м/б контролю кожні 6 год.	pH =7 t = 37 °С, τ = 28 год, відсутність сторонньої мікробіоти, w = 200 об/хв,
$К_т, К_м$ 5.7 Вирощування культури в інокуляторі	Посівний матеріал, pH, температура час, м/б	Термометр технічний, годинник, м/б	pH визначається перед культивуванням. Тривалість, температура, визначається під час	pH =7 t = 37 °С, τ = 28 год, відсутність сторонньої

об’ємом 630 л	чистота	контроль, швидкість перемішуваня тахометр, фотоелектроколориметр	вирощування, м/б контроль і конц.біомаси після стерилізації проби КР для м/б контролю кожні 6 год.	мікробіоти, w = 200 об/хв,
ТП 6. Виробничий біосинтез				
$К_т$,$К_м$ $К_х$ 6.1 Виробниче культивування в ферментері об’ємом 6,3 $м^3$	Культуральна рідина, pH, температура, час, швидкість перемішування м/б чистота	pH –метр Термометр технічний, годинник, м/б контроль тахометр, фотоелектроколориметр	pH визначається перед культивуванням. Тривалість температура під час стерилізації, м/б контроль після стерилізації проби КР для м/б контролю кожні 6 год.	pH = 7 τ = 72 год, t = 36,5°C, w = 200 об/хв, X = 4,66 г/л Концентрація 5г/л відсутність сторонньої мікробіоти.

8.2 Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль чистоти поживного середовища здійснюють для контролю стерильності поживних середовищ для вирощування інокуляту і середовищ для біосинтезу цільового продукту, а також для виявлення сторонньої мікробіоти у посівному матеріалі і культуральній рідині під час біосинтезу.

Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ здійснюють шляхом розсівання проби простерилізованого поживного середовища на чашки Петрі з відповідним агаризованим поживним середовищем: СА – для виявлення грибів і дріжджів і МПА – для виявлення бактерій [40].

Посіви здійснюють шляхом відбору стерильною піпеткою 0,1 мл з об’єма проби простерилізованого поживного середовища і нанесення її на поверхню відповідного поживного середовища. Внесену пробу рівномірно розподіляють по поверхні середовища за допомогою стерильного шпателя Дригальського. Чашки з посівами завертають у папір і поміщають у термостат за температури 32-34 °С протягом 3-5 діб для СА і 2-3 діб для МПА. На поверхні поживних середовищ візуально визначають відсутність ознак росту мікроорганізмів [40].

На поверхні поживних середовищ візуально визначають відсутність ознак росту мікроорганізмів.

Мікробіологічний контроль чистоти культури. Здійснюється двома шляхами: прямий висів на агаризовані поживні середовища і мікроскопіювання.

Прямий висів здійснюється посівом культуральної рідини до ізольованих колоній на чашки Петрі з глюкозо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій методом «Виснаженого штриха» [40].

При висіві на МПА штаму *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 на 24 годину інкубування при 37 ° С були отримані однотипні невеликі круглі колонії (діаметром 1 - 2 мм) шорсткою матовою поверхнею, нев'язкою консистенцією [41].

Мікроскопіювання проводять у світловому мікроскопі з імерсійною системою. Для приготування препарату на чисте знежирене предметне скло, в асептичних умовах, за допомогою стерильної петлі наносять невелику краплину культуральної рідини. Краплю, яка містить мікроорганізми, розподіляють по склу за допомогою бактеріальної петлі (діаметр мазка близько 1 см). Мазок висушують без нагрівання, при кімнатній температурі, до повного випаровування вологи. Потім на абсолютно сухий препарат за допомогою скляної палички наносять 1–2 краплини імерсійного масла. Після роботи ватою, змоченою етиловим спиртом, знімають залишки масла з імерсійного об’єктива [42].

Стрептококи та інші бактерії здатні утворювати мікрокапсули, особливо при культивуванні на середовищах, багатих на вуглеводи.

Капсулу можна розглядати у звичайному світловому мікроскопі, якщо забарвлювати нативні препарати простим методом. Однак для виявлення капсул частіше використовують метод Буррі-Гінса [41].

Мікроскопія препаратів бактерій на різних стадіях глибинного аеробного культивування з фарбуванням капсул по методу Омелянського показала, що штам *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 характеризується наявністю

слабовираженних капсул, які тоншають по ходу культивування та повністю зникають на стаціонарній фазі росту культури [16].

За відсутності у зразку сторонньої мікробіоти під час мікроскопіювання можна побачити клітини *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920, що мають овальну форму розміром 0,6-1,0 мкм, розташовуються у вигляді ланцюжків різної довжини, грампозитивні, нерухомі, не мають спор [41].

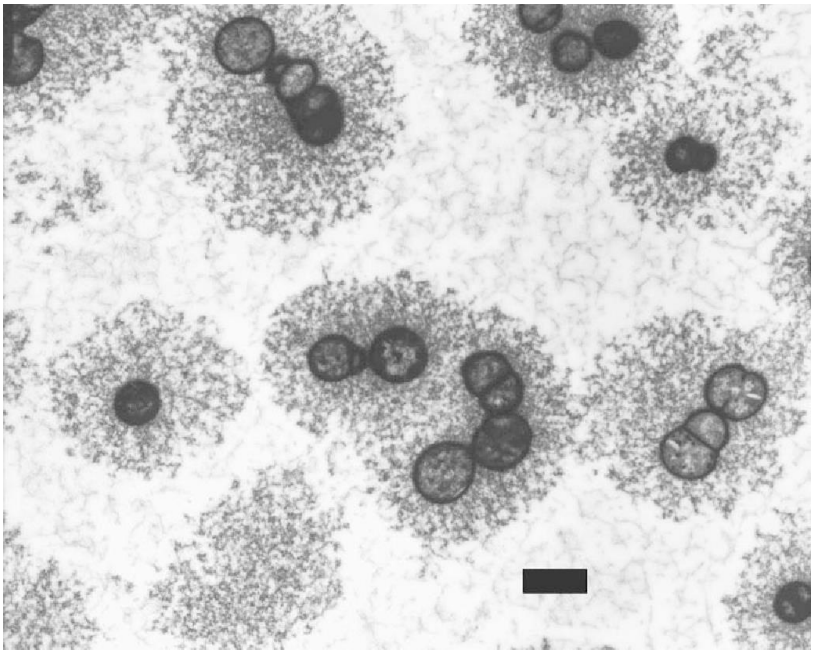


Рис.8.1. Розріз електронної мікрофотографії *Streptococcus zooepidemicus,* отримані з пізньої експоненційної фази аерованої культури біореактора [43]

8.3 Показники росту і синтезу цільового продукту

8.3.1. Визначення концентрації біомаси

Для визначення концентрації біомаси, необхідно взяти пробу культуральної рідини та визначити її оптичну густину із наступним перерахунком на абсолютно суху біомасу у відповідності з калібрувальним графіком. В роботі використовували апарат ФЕК при довжині 600 нм. [44]

У пробірки із 9 мл дистильованої води вносять по 1 мл культуральної рідини. Суміш збовтуємо, далі за допомогою приладу ФЕК вимірюємо оптичну густину (при довжині 600 нм). Концентрацію біомаси визначають за калібрувальним графіком [44].

8.3.2 Визначення концентрації гіалуронової кислоти

Концентрація гіалуронової кислоти у культуральній рідині визначали методом високоефективної рідинної хроматографії.

Суть методу: різний розподіл речовин у динамічних умовах між рухомою і нерухомою фазами.

Використовували рухливу фазу, що складається з буфера 0,05 М дигідрофосфата калію, pH доведено до 7,0 гідроксидом калію (10%). Хроматографію здійснювали при 25 ° С і обсяг розчину, що вводиться в колонку BioSep SEC S2000 (300 × 7,8 мм), становив 10 мкл, швидкість потоку 1,0 мл / хв. Виявлення проводили з використанням УФ-детектора при довжині хвилі 205 нм. Час утримування гіалуронової кислоти становило близько 4,9 хв при коефіцієнті асиметрії 1,93. pH рухомої фази може впливати на час утримування аналіту, а також чутливість виявлення [45].

8.3.3. Визначення концентрації джерела вуглецю та азоту

Визначення концентрації джерела азотного живлення методом формольного титруванням

Принцип методу. Визначення змісту амінного азоту в поживних середовищах проводять методом формольного титрування. Принцип методу заснований на блокуванні формальдегідом при pH 7,0 вільних аміногруп і титрування лугом еквівалентної кількості карбоксильних груп. Початок і кінець титрування визначають потенціометрично [46].

Реактиви:

1) натрію гідроксид (0,1 моль / л) або розчин соляної кислоти (0,1 моль / л);
2) натрію гідроксид 10% -й розчин;
3) розчин формаліну (40% -й розчин формальдегіду) * (ГОСТ 1625-75).

Опис процесу: Попередньо відібрану пробу об’ємом 1 мл центрифугують при 5000 об/хв, час – 30 хв. Для отримання супернатанта. Далі у склянку місткістю 50 мл наливають необхідний об’єм аналізованого супернатанту, що містить 1,5 - 5,0 мг амінного азоту, і доводять загальний об'єм дистильованою водою до 20 мл. Електроди потенціометра занурюють в досліджуваний розчин,

pH якого доводять до значення 7,0 за допомогою розчину натрію гідроксиду (0,1 моль / л) або розчину соляної кислоти (0,1 моль / л) .

До нейтралізуваного розчину додають 2 мл нейтрального формаліну, перемішують і, не виймаючи електроди, титрують вміст розчином натрію гідроксиду (0,1 моль / л) до pH 9,1. Проводять два паралельних вимірювання. Концентрацію джерела азотного живлення амінного азоту в досліджуваному препараті у відсотках (X) обчислюють за такою формулою:

$$X = \frac{V \cdot K \cdot 1{,}4 \cdot 100}{A \cdot 1000},$$ де

A - кількість рідкого зразка (мл), взятого на аналіз;

100 - коефіцієнт перерахунку міліграмів в відсотки;

1000 - коефіцієнт перерахунку міліграмів в грами.

Примітка:

- для рідких гідролізатів низького ступеня розщеплення (0,1 - 0,2% амінного азоту) «А» = 3 мл;
- для рідких гідролізатів середнього ступеня розщеплення (0,3 - 0,6% амінного азоту) «А» = 1 мл;
- для рідких гідролізатів високого ступеня розщеплення (0,7 - 1,3% амінного азоту) «А» = 0,5 мл;
- для рідких поживних середовищ (0,08 - 0,14% амінного азоту) «А» = 10 мл;
- для готових щільних агарових середовищ «А» = 3 мл препарату, розплавленого в киплячій водяній бані [46].

Визначення концентрації джерела Карбону

Підготовка проб: Відібрану пробу об'ємом 10 мл потрібно спочату відцентрифугувати при 3000 об/хв. протягом 15 хвилин. Потім супернатант фільтрували черех 0,22 мкм целюлозо-ацетатного фільтра (Sigma F-0139). Фільтрат розбавляли в 2 рази перед процесом ВЕРХ.

Опис процесу: система ВЕРХ представляла собою систему Jasco (Easton, MD) LC-800, оснащену насосом 880-PU і детектором показника заломлення 830-

RI. Дані були отримані з використанням хроматографічного інтегратора DP-700 (Carlo Erba, Мілан, Італія).

Зразки вводили за допомогою клапана 7125, забезпеченого петлею на 20 мкл (Rheodyne, Cotati, CA) на колонці з катіонообмінною (H^+) смолою Aminex FOA (Bio-Rad, Richmond, CA) (100 × 7,8 мм). id; 9 мкм), захищений захисною колонкою з того ж матеріалу. Аналіз проводили при 60 ° C зі швидкістю потоку 0,6 мл / хв з використанням ізократичного елюювання 0,01 M H_2SO_4 в якості рухомої фази. Елюент фільтрували перед аналізом з використанням нейлонової GV мембрани 0,22 мкм (Millipore, Bedford, MA) [47].

8.4. Визначення якості готового продукту

Ідентифікація гіалуронової кислоти

Характеристика ГК проводилася FTIR за допомогою спектрофотометру моделі FTIR (Jasco, Японія). Гіалуронову кислоту досліджувану порівнювали із зразком гіалуронової кислоти, що має стандарти закордонної фармакопеї.

Підготовка зразків гіалуронової кислоти перед спектрофотометрією:

Висушений бромід калію подрібнювали в лабораторній ступці. Потім додавали 2 мг стандартну ГК (як еталонну речовину) і перемішували, щоб отримати однорідну суміш. Далі суміш рівномірно розподіляли на грануляторі для отримання гранули. Гранулу ретельно відбирали з гранулятора і поміщали в тримач для зразків вимірювання в спектрофотометрі FTIR. Таким самим способом готували зразок гіалуронової кислоти дослідженої.

Зразок, що підлягав дослідженню, і еталонний стандартний зразок були підготовлені за тією ж процедурою, а зареєстровані спектри знаходились в діапазоні 4000-400 $см^{-1}$ (2,5-25 μм) при однакових робочих умовах.

Мінімум пропускання (максимум поглинання) у спектрі, отриманому з досліджуваним зразком ГК, відповідають положенню та відносному розміру до тих, що знаходяться в спектрі, отриманому з еталонного зразка.

Спектроскопія FTIR є потужним методом для ідентифікації функціональних груп та органічних сполук за оцінкою переходів між коливальними станами зв'язків, що містяться в молекулі. Спектр FTIR обох зразків тестують та їх хвилі показано на *рис.4.1.*

Положення піків з точки зору хвильового числа ($см^{-1}$) як еталонного стандарту, так і досліджуваного, продукованого *S. zooepidemicus* в оптимальних умовах, є однаковими. Цей спектр FTIR як еталонного стандартного, так і очищеного ГК у цьому дослідженні відповідав подібності в їх структурі.

Стандартна ГК показала кілька різких піків ($см^{-1}$), таких як 611.32, 1043.3, що може бути наслідком утворення зв'язків C-O-C. 1414.64, що відповідає наявності групи C-O з комбінацією C = O, 2892.7 наявність з'язку C-H та 3407.6, що підтверджує наявність зв'язку OH [48].

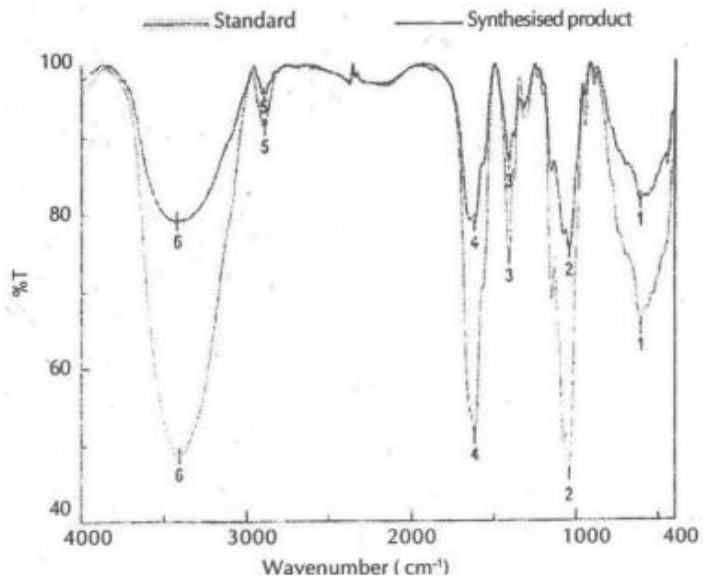


Рис.8.2. Характеристика досліджуваного зразка ГК на спектрофотометру моделі FTIR [48]

Подібні піки ($см^{-1}$) спостерігаються при дослідженої ГК, як зазначено в *рис.8.2.* Ці шість різних піків, отриманих у зразку ГК, мають порівняно подібне положення в порівнянні з положенням стандарту. Ці результати виявили схожість стандартного зразку гіалуронової кислоти та тестового зразка на пікових положень.

Peak No	Wave length (cm^{-1}) Reference HA standard	Wave length (cm^{-1}) Test HA sample
1	611.32	613.25
2	1043.30	1041.37
3	1411.64	1413.57
4	1616.06	1619.91
5	2892.70	2896.51
6	3407.60	3424.96

Рис.8.3. Положення піків досліджувального та контрольного зразків гіалуронової кислоти на спектрофотометру моделі FTIR

Вимірювання в'язкості гіалуроната натрію

Пробопідготовка. При вимірюванні в'язкості, був підготовлений буферний розчин для подальшого розведення гуалуроната натрію**.**

Розчин 1: 0,78 г дигідрофосфату натрію і 4,50 г хлориду натрію розбавили в 500 мл води очищеної.

Розчин 2: 1,79 г дінатрійгідрофосфата і 4,50 г хлориду натрію розбавили в 500 мл води очищеної.

Буферний розчин: Розчини 1 і 2 перемішали до досягнення значення pH 7,00. Перед використанням цей буферний розчин процідили через фільтр з пористого скла [49].

Приготування розведень натрій гіалуронту.

Чотири розведення кожного зразка гиалуроната натрію готували з вихідного розчину, як описано нижче.

Вихідний розчин: 0,2 г гіалуроната натрію розчинили в 50,0 г буферного розчину, перемішуючи розчин при 4 ° C протягом 24 годин.

Розведення A, B, C і D були отримані шляхом розведення подальшого кількості вихідного розчину (для розведення A) і потім розведення A для розведення B, C і D буферним розчином

Все розведені розчини перемішували протягом 20 хв і проганяли через фільтр з пористого скла, зливаючи перші10 мл.

Таблиця 8.2

Підготовка розчинів A, B, C і D гіалуроната натрію [9].

Разбавление	Исходный раствор	Разбавление А	Количество буферного раствора
Разбавление А	5,0 г	-	100,0 г
Разбавление В	-	30,0 г	10,0 г
Разбавление С	-	20,0 г	20,0 г
Разбавление D	-	10,0 г	30,0 г

Вимірювання та параметри приладу

Для вимірювання в'язкості [м3/ кг] розчинів гіалуронату був використаний мікровіскозіметр Lovis 2000 M в проточному режимі.

- Капіляр: діаметр 1,59 мм /боросилікатне скло; Шар: діаметр 1,5 мм / сталь; Ущільнювальні кільця: Viton extreme; Режим вимірювання: Полімер; Температура: 25 ° C; Температурна рівновага: 20 з; Циклів вимірювання: 3; Задається кут: Автоматичний; Дистанція вимірювання: Автоматичний; Коефіцієнт варіації: 0,3%

Результати.

Були виміряні чотири розведення кожного зразка (від 1 до 9), з якого була розрахована характеристична в'язкість [м3/ кг] відповідно по методу за Мартіном (таблиця 4.2.)

Визначення вологості

Визначення вологості після сушіння проводять за допомогою аналізатора вологості METRINCO M100MA . Спочатку проводиться попереднє зважування зразка, потім його поміщають до сушильної камери при температурі 60 °C , після чого знову зважують і визначають втрату вологи за допомогою розрахунків. Дискретність вологості приблизно 0,01%. [50].

Визначення pH

Суть методу. Потенціометричне визначення pH проводять шляхом вимірювання різниці потенціалів між двома відповідними електродами, зануреними у випробовуваний розчин: один з електродів чутливий до іонів водню (звичайно скляний електрод), другий — електрод порівняння (наприклад, насичений каломельний електрод).

Прилад. Вимірювальним приладом є вольтметр з вхідним опором принаймні у 100 разів більшим за опір використовуваних електродів. Прилад звичайно градується в одиницях pH і повинен мати таку чутливість, щоб можна було виявити відмінність принаймні 0.05 одиниць pH або 0.003 В.

Методика. Усі виміри проводять при тій самій температурі в інтервалі від 20 °C до 25 °C, показує залежність значень pH від температури для різних стандартних буферних розчинів, використовуваних для калібрування.. Прилад калібрують за допомогою буферного розчину калію гідрофталату (первинний стандарт) і одного з буферних розчинів з іншим значенням pH. Показання приладу для третього буферного розчину з проміжним значенням pH не мають відрізнятись більш як на 0.05 одиниць pH. Електроди занурюють у випробовуваний розчин і вимірюють pH у тих самих умовах, що і для буферних розчинів [51].

РОЗДІЛ 9. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ УЛЬТРАФІЛЬТРАЦІЇ

У загальному плані автоматизація виробництва – це етап машинного виробництва, що характеризується звільненням людини від безпосереднього виконання функцій управління виробничими процесами та передачею цих функцій технічним засобам – автоматичним пристроям і системам. В основі автоматизації виробництва лежить поняття управління (також використовується термін "керування") [52].

Для автоматизації обрана ділянка ультрафільтрації.

Під час процесу сепарування, фугат за допомогою відцентрового насоса подаватиметься у збірник для нативного розчину. Потім звідти, через циркуляційний насос і фільтр попередньої очистки, подається до головного удьтрафільтраційного модуля. Утворений ультраконцентрат повторно подається у збірник для проведення наступної технологічної операції.

Процесу ультрафільтрації проходить під тисокм 0,6 МПа.

Підбір пор ультрафільтраційної установки залежить від молекулярної маси гіалуронової кислоти, що концентруються. Даний етап передбачає необхідність відокремити домішки від цільового продукту.

Молекулярна маса якого складає $2{,}5\times10^6$ Да. Тоді, за розрахунками підбору типу мембрани для ультрафільтраційної установки, діаметр пор складе 26,45 нм.

Вибір продуктивністі насоса підбирається залежно від кількості розчину. В даному випадку продуктивність складе 400 л/хв.

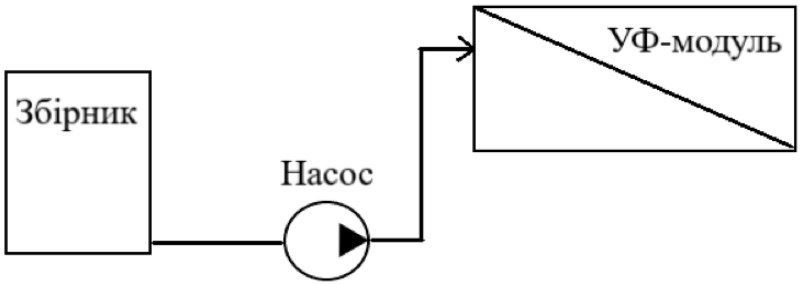


Рис. 9.1. **Апаратурно-технологічна схема ділянки ультрафільтрації**

Отже, автоматизація ультрафільтраційної установки повинна забезпечувати:

1. Контроль за рівнем рідини у збірнику для нативного розчину з сигналізацією досягнення верхнього припустимого рівня

2. Управління насосом перекачки рідини (включено/відключено) із збірника в ультрафільтраційний модуль

3. Контроль тиску в ультрафільтраційному модулі

Таблиця 9.1

Автоматизація ультрафільтраційної установки

№	Апарат	Параметр	Значення параметру	Вид автоматизації	Характер контролю та управління	Засіб управління та контролю, реалізації
1	Збірник нативного розчину	Рівень	80±3 %	Контроль	Сигналізація	АРМ оператора
2	Насос	Стан насосу подачі: зі збірника в УФ-модуль	Увімкнено /вимкнено	Управління	Ручне/дистанційне	Пуск/зупинка з АРМ оператора
3	Ультрафільтраційний модуль	Тиск	0,6 МПа±0,1 МПа	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора

Опис схеми автоматизації ультрафільтраційної установки:

У ***першому контурі*** автоматичного контролю, у збірнику для нативного розчину необхідно контролювати рівень рідини який має становити 80% .

Фугат, що надходять до збірника контролюється за допомогою датчика

рівня LE 1а.

У ***другому контурі*** автоматичного контролю необхідно контролювати ввімкнення/увімкнення насоса. За змінами спостерігає оператор - технолог на АРМі. Дані зміни зберігаються в архів.

Для управління передбачені конпки “Пуск/Стоп”.

Передбачено такі етапи автоматизації: управління з АРМа включенням/відключенням насосів; ручне управління з щита перетворювача включенням/відключенням насосів; аварійне відключення насосів кнопкою, роташовано біля насоса.

Для забезпечення безаварійної роботи насосів необхідно використати елементи управління (кнопки «Пуск» та «Стоп») в «ручному режимі» з щита управління SB2, та безпосередньо біля насосів SB1.

Для вибору місця, з якого саме буде здійснюватись управління, використовується тумблер SA1. Подача напруги на двигуни насосів здійснюється за допомогою магнітних пускачів КМ1.

У ***третьому контурі*** автоматичного контролю контролюється тиск в ультрафільтраційному модулі за допомогою датчика тиску PT 2а.

Таблиця 9.2

Специфікація засобів автоматизації

№	№ позиції	Найменування і технічна характеристика засобу	Тип, модель	Виробник
1	2	3	4	5
1	1а	Ємнісний датчик рівня,нержавіюча сталь; діапазон вимірювань 265-4000мм, максимальна температура +1250С, максимальний допустимий тиск 10бар, під’єднання G5/4;точність 2мм	NMC	Kobold.
2	КМ1	Магнітний пускач, номінальний струм 25 А Напружність 36 Вт Напруга ізоляції, В: 690	ПММ3/32	ПромФактор
3	SA1	Перемикач 3-х позиційний (автоматичний-ручний з щита – ручний по місцю) з фіксацією	3SB3210-2DA11	SIEMENS

4	SB1	Двоклавішна кнопочка станція «Пуск»-«Стоп» 1НО+1НЗ	8LP2T B7113	Lovato
5	2a	Диференційний перетворювач тиску, нержавіюча сталь, під'єднання 1/2NPT клас точності 0,075	PAD	Kobold

РОЗДІЛ 10. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

10.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів

Технологія одержання гіалуронової кислоти продуцентом *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 включає такі стадії:

- Допоміжні роботи: санітарна підготовка виробництва, приготування і стерилізація титрувальних розчинів, приготування і стерилізація поживних середовищ для одержання посівного матеріалу, приготування і стерилізація поживних середовищ для виробничого біосинтезу.
- Ферментаційні технологічні процеси: одержання посівного матеріалу і виробничий біосинтез гіалуронової кислоти.
- Післяферментаційні технологічні процеси: термічна обробка капсул бактерій, сепарування, ультрафільтрація, адсорбція, повторна ультрафільтрація, перехід у натрій гіалуронат, сушіння.

Санітарна підготовка виробництва

Щоденне прибирання та генеральне – використовуємо миючи розчини «Дезекон» та «Хлорантоїн» з інтервалом у 20 днів, з метою запобіганню резистентності. Далі відпрацьовані розчини йдуть до каналізації. Миття обладнання проходить у CIP-мийці з розчину Еклін – Н . Миючий розчин можемо далі застосовувати повторно у CIP-мийці, а промивна вода йде знову до каналізації. Тому даний етап є місцем емісії об'ємів *рідких відходів.*

Приготування та стерилізація титрувальних розчинів

- Підготовка 6% розчину соляної кислоти для регуляції pH до 4-4,5 на стадіях отримання посівного матеріалу в інокуляторах.
- Підготовка і стерилізація 6% розчину гідроксиду натрію для регуляції pH до 7 на стадії виробничого біосинтезу безпосередньо у ферментері.

Дана стадія не передбачає утворення рідких відходів із титрувальних розчинів, оскільки вони відповідають нормативним показникам і рівню асептики.

Приготування та стерилізація поживних середовищ для отримання посівного матеріалу та виробничого біосинтезу

Стадія може включати ризик невідповідності сировини до певних норм і показників, що знаходиться в пакувальних матеріалах, оскільки пакувальні матеріали слугують місцем утворенню твердих відходів. Тому таку стадію включаємо до місця утворення емісії *твердих відходів.*

Підготовка посівного матеріалу

Оскільки посівний матеріал використовується як для засіву ферментера, а отже і для виробничого біосинтезу, тому рідкі відходи від посівного матеріалу можемо не враховувати.

Streptococcus zooepidemicus є грампозитивною, не спороутворюючою, бактерією, що не рухається. Являється факультативним анаеробом, потребує аерації для вищого показника концентрації цільового продукту.

Виробничий біосинтез

Ціль стадії – отримання культуральної рідини, у якій накопичується цільовий продукт – гіалуронова кислота із капсул бактерії *Streptococcus zooepidemicus*. Після виробничого процесу, відпрацьоване повітря е місцем утворення *газоповітряних викидів.*

Термічна обробка капсул клітин

Культуральну рідину нагрівають протягом години для того, щоб вивільнити гіалуронову кислоту. Даний етап не передбачає утворенню відходів.

Сепарування

Культуральну рідину відокремлюють сепаруванням. Під дією відцентрових сил суспензія розділяється на осад і рідку фазу, яка називається фугатом. В результаті сепарування відділяється біомаса продуцента. Тому передбачаємо цю стадію місцем утворення *твердих відходів*.

Ультрафільтрація

Процес проходить за допомогою в УФ-установки. По закінченню процесу утворюється пермат, тому на даному етапі утворюються *рідкі відходи.*

Адсорбція домішок

Розчин обробляли активним вугіллям протягом 1 годин. На цьому етапі твердих відходів не передбачається.

Ультрафільтрація повторна

Процес проходить повторно за допомогою в УФ-установки. По закінченню процесу утворюється пермат, тому на даному етапі утворюються *рідкі відходи.*

Перехід у форму натрій гіалуронат

Процес відбуваєтья у збірнику. До сконцентрованої гіалуронової кислоти додається хлорид натрію, з метою отримання гіалуронату натрію. На цьому етапі відходів не передбачається.

Сушіння

Після процесу сушіння відпрацьоване повітря – це місце гізоповітряний викидів.

10.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

10.2.1. Система знешкодження рідких відходів

Сучасні рішення очистки повинні відповідати критеріям, які забезпечують якість очищення стічної води, високу інтенсивність процесу знешкодження, компактність очисних споруд при економії ресурсів і енергії, мінімальне утворенні вторинних відходів.

Біотенки доцільно застосовувати для очищення стічних вод з високою концентрацією органічних речовин.

Біотенки (аеротенки, де використовують іммобілізовану мікробну масу). У цих реакторах порівняно з аеротенками забезпечується краще використання кисню, а окиснювальна здатність зростає на 30%. Іммобілізація мікроорганізмів на носії підвищує швидкість окиснення відходів у 2–3 рази.

Носіями в біотенках слугують сітки, гофроленти з полівінілхлориду, полотнища з нетканинних матеріалів, конструкції із синтетичних матеріалів типу "йоржиків". Їхня здатність утримувати забруднення відповідно становить 4,5; 0,22; 0,45; 0,4 кг біомаси на 1 кг носія. Існує також модифікація біотенків – біореактори МакІСІ »

Застосування анаеробноаеробной технології очищення з анаеробними реакторами нового покоління дозволяють видаляти основну масу забруднень (до 80-95%) із стоків з високим вмістом органічних речовин при мінімальних енерговитратах і теплових втратах. Завдяки організації потоків стічної води в установці формуються гранули активного мулу діаметром до 2-5 мм.

Рис.2. принцип роботи очисної споруди «ДЖЕРЕЛО» [54].

Очисна споруда «ДЖЕРЕЛО» — установка для очищення стічних вод продуктивністю від 10 до 100 м^3 на добу. Технологія очищення передбачає використання вільноплаваючих і прикріплених на синтетичній насадці гідробіонтів, завдяки яким кількість надлишкового мулу зменшується в 5-10 разів в порівнянні з традиційними спорудами, чергування окислювальних та відновлювальних процесів, дрібнодисперсну аерацію, аеробно-анаеробну стабілізацію надлишкового мулу, автоматичне керування процесом очищення. Все це забезпечує стабільне і високоякісне очищення стічних вод [54].

10.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів.

За сортування пластику відповідають певні приватні або державні органазації. Паління сміття дозволене лише на підприємствах спеціального призначення і тільки з ціллю отримання енергії (теплової або ж електричної), але це лише буде

тригером забруднення навколишнього середовища. Всю тару слід посортувати, дуже щільно стискати, а вже далі відправляти на переробку до спеціально відведених організацій.

10.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів

Доцільним буде забезпечити виробництво очисною системою, що підвищить самопочуття персоналу і взагалі навколишнього середовища. В якості такої системи доцільно використовувати представника біологічних методів очистки газоподібних відходів, а саме біоскрубери.

Біоскрубер - це "мокрий" реактор, що працює за допомогою противотоку рідини (суміш води і активного мулу) та забрудненого газу. Можливо виготовлення скрубера із пластику зі скловолокном або нержавіючої сталі. Ступінь очистки досягає 95-99%. Газоочисні установки з біоскрубером застосовують в ливарній, хімічній, харчовій промисловостях, в очистці стічних вод та переробці відходів.

Принцип його роботи такий - забруднене повітря подається до абсорбера, де відбувається змішування повітря і води, далі дана суміш подається в головний реактор, де відбувається її обробка мікроорганізмами активного мулу, що призводить до очистки повітря від шкідливих домішок, після чого вода подається на початок процесу, а очищене повітря виходить через верх абсорбера в момент подачі цієї води [55].

Список літератури

1. *Сигаева Н., Колесов С., Назаров П., Вильданова Р*. Химическая модификация гиалуроновой кислоты и ее применения в медицине. Институт органической химии УНЦ РАН, 2012. Т. 17. №3. С. 1220
2. Эпидемиология остеоартроза. Компендиум Лекарственные препараты [Електроний ресурс] Режим доступу: https://compendium.com.ua/clinical-guidelines/osteoartroz-prakticheskoe-rukovodstvo/glava-1-epidemiologiya-osteoartroza/
3. Лікування пацієнтів з остеоартрозом колінних, кульшових та кистьових суглобів [Електроний ресурс] Режим доступу: https://health-ua.com/article/61426-lkuvannya-patcntv-zosteoartrozom--kolnnih-kulshovih-takistovih-suglobv
4. MedUM справочник лекарственных препаратов [Електронний ресурс] Режим доступу: https://medum.ru/gialgan-fidiya-ukoly
5. *Kalyagin A.N, Anoshenkova O.N, Antipova O.V.* Hyaluronic acid formulations in osteoarthritis: Possibilities for import substitution. Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya. Rheumatology Science and Practice. 2016;54(5):601-606 (In Russ.). doi: http://dx.doi.org/10.14412/1995-4484-2016-601-606
6. Гиалуроновая кислота. Получение и применение. [Електроний ресурс] Режим доступу: http://hawkish.ru/%D0%B3%D0%B8%D0%B0%D0%BB%D1%83%D1%80%D0%BE%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D1%8F-%D0%BA%D0%B8%D1%81%D0%BB%D0%BE%D1%82%D0%B0/
7. *Petr Snetkov, Kseniia Zakharova, Svetlana Morozkina.* Hyaluronic Acid: The Influence of Molecular Weight on Structural, Physical, Physico-Chemical, and Degradable Properties of Biopolymer. *Polymers (Basel).* 2020 Aug; 12(8): 1800. doi: 10.3390/polym12081800
8. Pat. WO 2012/032154 Al. Process for the production of hyaluronic acid in Escherichia coli or Bacillus subtilis // Corsa V., Negro A., Vaccaro S., Messina L. - Publ. 15.03.2015.

9. *Pan N., Vignoli J., Baldo C*. Effect of fermentation conditions on the production of hyaluronic acid by Streptococcus zooepidemicus ATCC 39920. *Acta Scientiarum.* ISSN printed: 1679-9283. Doi: 10.4025/actascibiolsci.v37i4.28176
10. *Li, Y., Li, G., Zhao, X., Shao, Y., Wu, M., & Ma, T. (2019).* Regulation of hyaluronic acid molecular weight and titer by temperature in engineered Bacillus subtilis. *3 Biotech, 9(6). doi:10.1007/s13205-019-1749-x*
11. *Ji Eun Woo, Hyeon Jeong Seong*. Metabolic Engineering of Escherichia coli for the Production of Hyaluronic Acid From Glucose and Galactose. *Front Bioeng Biotechnol*. 2019; 7: 351. Doi: 10.3389/fbioe.2019.00351
12. *Pan, N. C., Vignoli, J. A.* Effect of fermentation conditions on the production of hyaluronic acid by Streptococcus zooepidemicus ATCC 39920. Acta Scientiarum. *Biological Sciences*, 37(4), 411 (2015) doi:10.4025/actascibiolsci.v37i4.28176
13. *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*. VetBact Swedish/svenska Veterinary bacteriology: information about important bacteria [Електроний ресурс] Режим доступу: https://www.vetbact.org/?artid=15
14. Гиалуроновая кислота - разбираемся в практической пользе [Електронний ресурс] Режим доступу: https://sayyes.com.ua/pit-ili-ne-pit-gialuronovaya-kislota-razbiraemsya-v-prakticheskoy-polze/
15. *Hélder Pereira, Duarte Andre Sousa, António Cunha, Renato Andrade, J. Espregueira-Mendes, J. Miguel Oliveira, and Rui L. Reis. Hyaluronic Acid. Adv Exp Med Biol 2018;1059:137-153. doi: 10.1007/978-3-319-76735-2_6.*
16. Остеоартроз. Клінічна настанова. Державний експертний центр МОЗ України. Асоціація ревматологів України. Асоціація ортопедів-травматологів України 2017.
17. ГИАЛГАН (HYALGAN®) Компендиум Лекарственные препараты [Електроний ресурс] Режим доступу: https://compendium.com.ua/info/166552/gialgan/

18. Суплазин 1-Shot раствор д/ин. 60 мг/6 мл по 6 мл №1. зе [Електронний ресурс] Режим доступу: https://tabletki.ua/%D0%A1%D1%83%D0%BF%D0%BB%D0%B0%D0%B7%D0%B8%D0%BD-1-shot/1015761/
19. Сертобек ПРО [Електроний ресурс] Режим доступу: https://tabletki.ua/uk/%D0%A1%D0%B5%D1%80%D1%82%D0%BE%D0%B1%D0%B5%D0%BA%D0%BF%D1%80%D0%BE/1015818/pharmacy/kiev/
20. Ферматрон плюс [Електроний ресурс] Режим доступу: https://artromed.zakupka.com/p/573480956-fermatron-plyus-fermathron-2-ml-1/
21. Остеніл плюс [Електроний ресурс] Режим доступу: https://artromed.zakupka.com/p/185799730-ostenil-plyus-ostenil-plus/
22. *Xuzhen Zhang, Man Wang, Tuanjie Li, Lixia Fu, Wei Cao, and Hao Liu*. Construction of efficient Streptococcus zooepidemicus strains for hyaluoronic acid production based on identification of key genes involved in sucrose metabolism. *AMB Express*. 2016; 6: 121, doi: 10.1186/s13568-016-0296-7
23. *Long Liu, Yanfeng Liu, Jianghua Li.* Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microbial Cell Factories* volume 10, 2011
24. *Chong FB, Blank LM, Mclaaughlin R, Nielsen LK*: Microbial hyaluronic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005, 66: 341-351. 10.1007/s00253-004-1774-4
25. *Stanislav Sokolenko, Marco Quattrociocchi*. Identifying model error in metabolic flux analysis – a generalized least squares approach. *BMC Syst Biol.* 2016, doi: 10.1186/s12918-016-0335-7
26. *Pires AMB, Santana MH*: Metabolic effects of the initial glucose concentration on microbial production of hyaluronic acid. *Appl Biochem Biotechnol*. 2010, 162: 1751-1761. 10.1007/s12010-010-8956-6

27. Технология микробного синтеза: электронный курс лекций для студентов специальности 1-48 02 01 «Биотехнология» / Н. С. Ручай, И. А. Гребенчикова. – Минск : БГТУ, 2014. – 167 с.
28. Промышленный ферментер 1000л. *Biorus* Електроний ресурс [Режим доступу] https://bio-rus.ru/primeryi-speczifikaczij/promyishlennyij-fermenter-biorus-1000-l-dlya-veterinarii.html
29. *Adriano H. Oliveira1, Cristiane C. Ogrodowski.* Cashew apple juice as microbial cultivation medium for non-immunogenic hyaluronic acid production Brazilian Journal of Microbiology 44, 4, 1097-1104 (2013) http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822014005000017
30. *Карлаш Ю.В.,Омельчук Є.О.* Основи проектування біотехнологічних виробництв. [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр»спеціальності 162 «Біотехнолгії та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної формнавчання/ Ю.В.Карлаш, Є.С. Омельчук – К:НУХТ,2019-252 с.
31. Порядок організації роботи з державної реєстрації (перереєстрації) дезінфекційних засобів та ведення Державного реєстру дезінфекційних засобів [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://moz.gov.ua/uploads/3/18681-pro_20200206_1_dod.pdf
32. Сучасні дезинфікуючі засоби та їх застосування в медицині [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://www.medsprava.com.ua/article/413-qqq-16-suchasn-deznfkuyuch-zasobi-ta-h-zastosuvannya-v-meditsin
33. Дезекон. [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://interdez.com.ua/product/dezinficiruyuschee-sredstvo-desekon-om-baltiachemi-kiev
34. Державна Санітарно-Епідеміологічна Служба України. Методичні вказівки щодо застосування засобу «Хлорантоїн» з метою дезинфекції об’єктів та достерилізаційного очищення виробів медичного призначення., - Київ, 2013р.

35. Бионол, средство для дезинфекции поверхностей, предстерилизационной очистк [Електронний ресурс] – Режим доступу : https://dezmedtex.com.ua/p1002295754-bionol-sredstvo-dlya.html
36. Еклін – Н [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://prom.ua/p1148177497-nejtralnoe-moyuschee-sredstvo.html
37. *Arianna Fallacara, Erika Baldini, Stefano Manfredini.* Hyaluronic Acid in the Third Millennium. *Polymers (Basel).* 2018 Jul; 10(7): 701.Published online 2018 Jun 25. doi: 10.3390/polym10070701
38. *K. Jagadeeswara Reddy K.T.* Karunakaran Purification and characterization of hyaluronicacid produced by Streptococcus zooepidemicus strain 3523-7 Jagadeeswara Reddy & Karunakaran J. BioSci. Biotech. 2013, 2(3): 173-179.
39. *Sungchul Choi, Woncheol Choi.* Purification and biocompatibility of fermented hyaluronic acid for its applications to biomaterials Biomater Res. 2014; 18: 6. Published online 2014 Jun 13. doi: 10.1186/2055-7124-18-6
40. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.
41. Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Малашенко Ю.Р., Пинчук Г.Э. Микробный синтез экзополисахаридов на С1–С2–соединениях. – К.: Наук. думка, 1992. – 212 с.
42. *Morag R. Graham, Laura M. Smoot.* Virulence control in group A *Streptococcus* by a two-component gene regulatory system: Global expression profiling and *in vivo* infection modeling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Oct 15; 99(21): 13855–13860.doi: 10.1073/pnas.202353699
43. B. F. Chong, L. Blank, Microbial hyaluronic acid production. Corpus ID: 19486509. DOI:10.1007/s00253-004-1774-4.doi:10.1007/s00253-004-1774-4

44. Загальна біотехнологія: Лабораторний практикум для студ. напряму 6.051401 "Біотехнологія" ден. та заоч. форм навч. / Уклад.: Ю.М. Пенчук, С.О. Старовойтова, В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2010. — 71 с.
45. Амандусова А.Х. К. Р. Савельева К. Р. Физико-химические свойства и методы количественного определения гиалуроновой кислоты (обзор). Методы анализа лекарственных средст Analytical Methods. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-136-140
46. Методы контроля. Биотехнологические и микробиологические факторы. Методы контроля бактериологических питательных сред. Методические указанияМУК 4.2.2316-08 Москва, 2008
47. *Giuseppina Paola Parpinello and Andrea Versari.* A Simple High-Performance Liquid Chromatography Method for the Analysis of Glucose, Glycerol, and Methanol in a Bioprocess. Dipartimento di Biotecnologie Agrarie ed Ambientali, Università di Ancona, Via Brecce Bianche, 60130 - Ancona, Italy
48. *K. Jagadeeswara Reddy K.T. Karunakaran* Purification and characterization of hyaluronicacid produced by Streptococcus zooepidemicus strain 3523-7 Jagadeeswara Reddy & Karunakaran J. *BioSci. Biotech.* 2013, 2(3): 173-179.
49. Вимірювання в'язкості гіалуроната натрію відповідно до Європейської Фармакопеї [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://paar.ru/upload/iblock/ed2/ed251a0f4a429a02169ebf8292fff55d.pdf
50. Аналізатор вологості http://metrinco.com/uk/analizatory-volohosti/laboratornyi-analizator-volohosti-metrinco-m100ma
51. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. —Доповнення 2. — Харків: Державне підприємство «Науковоекспертний фармакопейний центр», 2008. — 620 с. ISB N 966-96478-1-9
52. Ельперін, І.В. Автоматизація виробничих процесів: підруч. / І.В.Ельперін, О.М.Пупена,
53. В.М.Сідлецький, С.М.Швед – Вид. 2-ге, виправлене - К.: Вид. Ліра-К, 2015. – 320 с.

54. Локальна споруда «ДЖЕРЕЛО» [Електронний ресурс]: https://ecology.com.ua/ru/products/localni-ochistitelnye-sooruzheniya-dgerelo/
55. Шестопалов О. В., Пітак І. В. Аналіз існуючих процесів та апаратів біологічної очистки газових викидів. Процессы и оборудование Пищевых и химических Производств. — № 3/5(17), 2014.