

## **Economic, Technological and Regulatory Aspects of Biotechnologically Derived Glycosaminoglycans in Modern Cosmetology**

*M. Hryshchenko, S. Starovoitova*

*National University of Food Technologies*

*Today, there is a significant demand for cosmetic products containing glycosaminoglycans (GAGs), in particular hyaluronic acid as the most popular anti-aging component due to its ability to attract water. This can be seen by analyzing the few scientific publications that describe the advantages and disadvantages of different methods of obtaining GAGs. As the analyzed sources show, microbial synthesis is the most optimal method of obtaining and already today the vast majority of hyaluronate is obtained precisely in this way. However, given that the natural producers of hyaluronic acid (HA) are mostly pathogenic microorganisms that grow on media with brain-heart infusion or blood, publications pay special attention to optimizing cultivation conditions, genetic engineering and other modern technologies to achieve a cleaner product that does not contain pathogenic agents. Currently, the genetically modified strain *Bacillus subtilis* 3NA is recognized as the most efficient and non-pathogenic producer of hyaluronic acid, which allows obtaining 7 g/l of HA. Although this is not as much compared to *Streptococcus equisp. equi* (12 g/l), it significantly reduces the risk of obtaining contaminated hyaluronate and reduces the cost of additional purification of the target product. Thanks to genetic engineering, it was possible to obtain chondroitin, alginate and heparin by microbiological means, which is much more environmentally friendly and safe than extraction from animal raw materials.*

*Based on modern scientific publications, various methods of post-fermentation purification of GAGs were analyzed and it was found that electrofiltration is cost-effective for cleaning HA on an industrial scale.*

*Given the widespread use of GAGs in cosmetology for daily use, the quality requirements for glycosaminoglycans as raw materials for cosmetic products are an important issue, so the regulatory support of these compounds as raw materials for cosmetic use in Ukraine, the European Union (EU) and the USA was analyzed. As can be seen, Ukraine is trying to harmonize its regulatory framework in accordance with European standards, namely the requirements of EU Regulation No. 1223/2009. In the USA, quality control of cosmetic raw materials is less formalized, but also quite effective*

***Key words: glycosaminoglycans, hyaluronic acid, cosmetology, microbial synthesis, chondroitin sulfate, heparin.***

**Економічні технологічні та нормативні аспекти глікозаміногліканів біотехнологічного походження в сучасній косметології**

*М. Грищенко, С. Старовойтова*

*Національний університет харчових технологій*

*На сьогодні, відзначається значний попит на косметичні засоби з глікозаміногліканами (ГАГ), зокрема гіалуроновою кислотою як найпопулярнішим anti-age компонентом завдяки її здатності притягувати воду. Це можна помітити аналізуючи численні наукові публікації в котрих описуються переваги і недоліки різних способів отримання ГАГ. Як показують ці джерела найоптимальнішим способом одержання даних сполук є мікробний синтез і вже на сьогодні переважну більшість гіалуронату отримують саме цим способом. Але враховуючи те, що природні продуценти гіалуронової кислоти (ГК) це переважно патогенні мікроорганізми, для росту котрих використовують середовища з серцево-мозковою інфузією чи кров'ю, в публікаціях особлива увага приділяється оптимізації умов культивування, генетичній інженерії та іншим сучасним технологіям для досягнення більш чистого продукту, що не міститиме патогенних агентів. Наразі, найефективнішим та непатогенним продуцентом гіалуронової кислоти визнано генетично-модифікований штам *Bacillus subtilis* ЗНА, котрий дозволяє отримати 7 г/л ГК. Хоча це не так багато якщо порівнювати з *Streptococcus equisp. equi* (12 г/л), зате значно знижується ризик отримання забрудненого гіалуронату і зменшуються витрати на додаткове очищення цільового продукту. Завдяки генній інженерії вдалося отримати хондротойн, альгінат та гепарин мікробіологічним шляхом, а це значно екологічніше та безпечніше ніж екстракція з тваринної сировини.*

*На основі сучасних наукових публікацій, було проаналізовані різні методи післяферментаційного очищення ГАГ і виявлено, що в промислових масштабах економічно вигідною є електрофільтрацію при очищенні ГК.*

*Враховуючи широке застосування ГАГ в косметології для щоденного використання важливим питанням є вимоги до якості глікозаміногліканів, як сировини для косметичних засобів, тому проаналізовано нормативне забезпечення даних сполук, як сировини для косметичного використання в Україні, Європейському Союзі (ЄС) та США. Сьогодні Україна намагається гармонізувати свою нормативну базу відповідно до європейських стандартів, а саме вимог регламенту №1223/2009 ЄС. В США контроль якості косметичної сировини менш формалізований, але теж доволі ефективний.*

**Ключові слова:** *глікозаміноглікани, гіалуронова кислота, косметологія, мікробний синтез, хондротойн сульфат, гепарин*

**Постановка проблеми.** Косметологія та beauty-індустрія з кожним роком набуває все більших та більших обертів, адже сучасна поп-культура лише сприяє цьому (Lee, & Kwon, 2022). Вже сьогодні, індустрія краси є однією з найбільш динамічних та прибуткових галузей у світі бізнесу. Так, її дохід в 2021 році склав 80,74 мільярда доларів (Almotrefi, Gangwani, Alshahrani, & Ibrahim, 2023; Rathod, Mali, Shinde, & Aloorkar, 2020). Зростання популярності соціальних мереж, збільшення уваги до догляду за шкірою та діагональний розвиток інтернет-торгівлі призвели до того, що споживачі стали більше витрачати на продукти краси. Також варто відзначити, що відбулися певні зміни в цій сфері, якщо раніше питання краси стосувалося виключно естетичного зовнішнього вигляду і обмежувалося декоративною косметикою, то зараз на першому місці стоїть догляд за шкірою та попередження проблем із зовнішністю. І це видно по маркетинговим дослідженням, так очікується, що світовий ринок засобів проти старіння збільшиться в середньорічному темпі приблизно на 6,8% до 2027 року (Salvador Ferreira, Magalhães, Sousa Lobo, & Almeida, 2020).

Враховуючи вище наведену інформацію стає не дивно, що зараз стоїть питання запровадження нових ефективних косметичних інгредієнтів, котрі допоможуть в боротьбі зі старінням шкіри. Важливо розглядати косметичні інгредієнти, котрі мають високу біологічну активність та диференціальну

регуляцію процесу старіння (Wang, Neo, & Betts, 2021). І такими інгредієнтами є глікозаміноглікани, адже вони мають високу ендогенну експресію в шкірі, плейотропну біологічну дію (здатність викликати різноманітні біологічні ефекти) та, на жаль, ослаблено експресуються (виробляються) у віковій шкірі.

Переважає більшість наукових статей що присвячена глікозаміногліканам, стосуються сфер їх застосування. Наприклад, ефективність даних сполук для регенерації ушкоджених тканин (Menezes, Vincent, Osorno, & Arinzeh, 2023), для боротьби з раковими захворюваннями (Wieboldt, & Läubli, 2022), для офтальмологічних застосувань (Segars, & Trinkaus-Randall, 2023), для боротьби з коронавірусом (Möller та ін., 2022), для застосування в якості пребіотиків (Rawat, Seyed Hameed, Meng, & Liu, 2022).

Як можна побачити спектр використання даних сполук доволі широкий, а попит відповідно високий, отже є потреба у вивченні та аналізі сучасних способів отримання ГАГ, щоб задовольнити потреби споживачів. Тому, **метою даної роботи** є огляд та узагальнення літературних джерел котрі стосуються оптимізації виробництва глікозаміногліканів задля задоволення економічних, екологічних та нормативних вимог суспільства.

**Матеріали і методи.** Для написання даного огляду були використані зарубіжні та вітчизняні наукові публікації у провідних періодичних і спеціалізованих світових виданнях, що стосуються оптимізації методів отримання глікозаміногліканів з переважним акцентом на мікробіологічний спосіб одержання. Пошук наукових статей проводився за допомогою світових наукометричних баз даних, таких як Google Scholar та PubMed.

**Викладення основних результатів дослідження. Глікозаміноглікани як ефективні косметологічні інгредієнти.** Одними із перспективних та сучасних косметичних інгредієнтів, є глікозаміноглікани. Даний клас речовин є невід'ємною частиною міжклітинного матриксу шкіри, що відіграє важливу роль у забезпеченні її структурної цілісності та еластичності.

В загальному дані сполуки можна поділити на 4 групи гепарин та гепаран сульфати, хондроїтин сульфат та дерматансульфат, кератан сульфат і

гіалуронат/гіалуронова кислота (Radhouani, Correia, Gonçalves, Reis, & Oliveira, 2021).

Хондроїтин сульфат допомагає зберігати еластичність та зволоженість шкіри, бореться з ознаками старіння, сприяє загоєнню та захисту від зовнішніх агентів. Дерматан сульфат стабілізує фактори росту цитокінів та має антикоагулянтні властивості. Гепарин та гепаран сульфат можуть контролювати ріст та проліферацію клітин, що може покращити структуру шкіри (Wang, Neo, & Betts, 2021), (Sahu, Shrama, Jayakumar, Madhan, & Zameer, 2022). Однак, найкращі косметичні ефекти приписують гіалуроновій кислоті. Вона займає особливе місце в косметології, адже відіграє важливу роль у кількох біологічних функціях клітини – адгезії, фіксації, рості, міграції – і діє як сигнальна молекула в клітинній рухливості, запаленні, загоєнні ран, метастазах раку та клітинному метаболізмі (Mendoza-Muñoz та ін., 2023).

***Способи одержання глікозаміногліканів.*** На сьогоднішній день більшість глікозаміногліканів, за винятком гіалуронату виготовляються екстракцією з тваринних тканин, але цей метод досі має чимало недоліків, зокрема поганий контроль над тваринною сировиною, потенційний ризик захворіти зоонозними інфекціями, ендотоксинами чи пріонами, адже ланцюг постачання тваринних тканин на бойні не контролюється Current Good Manufacturing Practice for Human and Veterinary Drug and Biological Products (CGMP, 2016). Це керівництво містить вимоги Управління з контролю за продуктами та ліками США (FDA), щодо виробництва лікарських засобів та біологічних продуктів для людини і тварин, включаючи стандарти щодо: організації виробництва, персоналу, приміщень та обладнання, контролю якості, виробництва за правилами GMP, лабораторного контролю, упаковки та маркування. В Україні гармонізованим документом є настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2020"Лікарські засоби. Належна виробнича практика" (GMP, 2020) і в ньому прописані лише вимоги до постачання тваринної сировини з боєнь: «Якщо джерелом одержання тваринних тканин є бойні, має бути показано, що вони працюють за стандартами, еквівалентними тим, що застосовують в ЄС. Слід взяти до уваги

доповіді від таких організацій, як Продовольча та ветеринарна служба (Food and Veterinary Office), що перевіряють дотримання вимог стосовно безпеки та якості харчових продуктів, ветеринарних і фітосанітарних норм законодавства в рамках ЄС і в третіх країнах, що експортують до ЄС». Можна помітити, що теж не зазначено особливих вимог до ланцюга постачання тваринних тканин на бойні. Таким чином можна отримати глікозаміноглікани з різних видів тварин і різних тканин, а це відповідно впливає на стабільність та якість продукту (Jin, Zhang, & Linhardt, 2021).

В процесі виробництва ГАГ з тваринних джерел складно контролювати сульфатійні шаблони (особливості конфігурації сульфатійних груп у молекулі глікозаміногліканів). Це може призводити до непередбачуваних властивостей продукту та ускладнювати його стандартизацію (Gottschalk, & Elling, 2021)

Але основним недоліком тваринного виробництва є те, що зараз в світі існує велика тенденція на cruelty-free (яка не тестується на тваринах) та веганську (в складі котрої не містяться тваринні інгредієнти) косметику, навіть Європейський Союз (ЄС) визначив недопустимий метод тестування косметичних засобів на тваринах відповідно до Регламенту ЄС № 1223/2009 про косметичні засоби (Cosmetic Regulation 1223/2009, 2009). Деякі споживачі свідомо відмовляються від косметики, що містить інгредієнти тваринного походження, тому щоб не втрачати величезну частину потенційних покупців, досліджують нові біотехнологічні способи отримання ГАГ (Cristiano, & Guagni, 2022). Саме тому тваринний спосіб отримання глікозаміногліканів потребує заміни.

Одним з способів покращити промислове одержання глікозаміногліканів і уникнути недоліків тваринного виробництва є хімічний синтез. Хоч у клінічній практиці використовується хімічно синтезований пентасахарид гепарину, відомий як фондапаринукс натрію (Jin, Zhang, & Linhardt, 2021), але не зважаючи на це, хімічний спосіб складно використовувати для синтезу сульфатованих глікозаміногліканів, адже правильну структурну сульфатію молекул ГАГ складно досягти через необхідність захисту/дегідрування

амінокислотних та ОН-груп, а також через процеси фракціонування та очищення, які зменшують виходи та неефективні з точки зору часових та витратних ресурсів для великомасштабних процесів (Gottschalk, & Elling, 2021).

Мікробна інженерія виглядає як найкращий альтернативний метод виробництва ГАГ, оскільки хімічний синтез має недоліки, такі як складність та багатоетапність самого процесу одержання цільових сполук та токсичні побічні продукти. А хемоферментний синтез вимагає дорогих ферментів і чистих компонентів, що теж доволі затратно. Мікробна інженерія є менш складною, відносно дешевою, практично не створює негативного впливу на навколишнє середовище та забезпечує менші шанси для передачі захворювання (Awofiraneye, та ін., 2022). А головне мікробний синтез дозволяє отримати чистий продукт в контрольованих умовах. (Balbinot-Alfaro та ін., 2021).

**Оптимізація отримання гіалуронової кислоти.** Так, для біотехнологічного виробництва ГК використовують представників родини *Streptococcus*, а саме *Streptococcus zooepidemicu*, *Streptococcus equisp*, *Streptococcus thermophiles*. Для підвищення виходу цільового продукту застосовують різні підходи оптимізації бродіння, зокрема:

1. Для *Streptococcus zooepidemicu* намагалися підібрати інше середовище культивування, котре не містило б крові овець та мозково-серцевої інфузії, адже саме ці інгредієнти підвищують ризик перехресного зараження. Узагальнені дані виходу цільового продукту за різних джерел карбону наведені в таблиці 1.

**Таблиця 1. Вплив джерела вуглецю на вихід гіалуронової кислоти у *Streptococcus zooepidemicu***

Джерело Карбону	Вихід ГК (г/л)	Джерело
Сирна сироватка	3.2	(Amado, Vázquez, Pastrana, & Teixeira, 2016)

Меяса цукрової тростини	2.8	(Pan, Pereira, da Silva, Vasconcelos, & Celligoi, 2017)
Сік з яблук кешью	1.76	(Oliveira, Ogrodowski, de Macedo, Santana, & Gonçalves, 2014)
Екстракт ріжкового дерева	2.6	(Ozcan, Germec, & Turhan, 2022)
Соевий пептон	0.3	(Benedini, & Santana, 2013)
Відходи рибної промисловості	2.3	(Vázquez та ін., 2015)

2. У *Streptococcus equisp. equi* завдяки правильно підібраному режиму бродіння та концентрації сахарози (80 г/л) вдалося досягти виходу ГК 12 г/ л за умов реакції рН 7,8, температура інкубації 33 °С, час інкубації 24 години та швидкість перемішування 187 об/хв. Це один з найкращих результатів, адже на разі в промисловості переважно використовували *S. Zooepidemicus* з продуктивністю до 7 г/л (Cai, Zhang, Kumar, & Wyman, 2014; Amado, Vázquez, Pastrana, & Teixeira, 2016).

3. *Streptococcus thermophiles*. У дослідженні (Cai, Zhang, Kumar, & Wyman, 2014) результати показують, що найкраще виробництво гіалуронової кислоти у *S.thermophilus* було з бактерій, вирощених на альтернативному середовищі, що містить сироватку 450 мл/л та 7,5 г/л дріжджового екстракту. Культивування проводили при 40 °С, при рН 6,8 і швидкості перемішування 150 об/хв протягом 18 годин. Ці дії дозволили насинтезувати 0,598 г/л ГК.

Звісно не обійшлося без методів генної-інженерії, адже дикі штами як правило не є потужними продуцентами, тому вчені створюють різні рекомбінантні штами, наприклад *Streptococcus zooepidemicus* R42. Так, (Abbas Mohammed, & Niamah, 2022) в *Streptococcus zooepidemicus* внесли ген синтезу

бактеріального гемоглобін (Vhb). Таким чином знизилася накопичення молочної кислоти, що гальмує ріст даної бактерії та відповідно виробництво цільового продукту. Далі, завдяки серії обробки клітин N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідом (NTG) було створено гіалуронідазо-негативний та рифампіцинорезистентний мутантний штам, який виробляє 6,7 г/л гіалуронової кислоти.

Але, як показують дослідження (Lu та ін., 2016) проблема не лише в кількості синтезу ГК, а й у чистоті виходу, адже природні продуценти ГК – це зоонозні патогени, а їхній продукт синтезу містить в собі чимало ендотоксинів, що роблять його непридатним для безпосереднього використання у медицині, косметичі чи інших галузях, тому потрібно проводити додаткові операції з очищення та виділення ГК, що стають доволі затратними.

В ідеалі найбільш підходящий мікроорганізм для виробництва ГК повинен мати статус GRAS (Generally recognized as safe - загалом вважається безпечним), не виділяють жодних токсинів і можуть безперервно виробляти біополімер, щоб він міг досягати принаймні 1 мегадальтон (МДа). Молекулярна маса (MW) і чистота ГК вказують на її якість: полімери з більшою MW (>0,5 MDa) мають більшу ринкову вартість. З мікробної точки зору, виробництво такого полімеру також є проблемою через його високу вартість метаболічної енергії, тому зараз відбуваються активні дослідження та спроби створити непатогенний високопродуктивний штам мікроорганізму. Наразі було створено широкий спектр гетерологічних продуцентів, включаючи: *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Kluyveromyces lactis*, *Escherichia coli*, *Streptomyces albulus*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* (de Oliveira та ін., 2016). Узагальнені дані, щодо генетичних маніпуляцій з потенційними продуцентами гіалуронової кислоти наведено в таблиці 2.

**Таблиця 2. Генетичні модифікації для створення синтетиків гіалуронової кислоти**

Мікроорганізм	Використані Плазмідні/Гени	Оптимізація	Вихід ГК (г/л)	Джерело
<i>Lactococcus lactis</i> NZ9000 VRJ3ABC	pRKN, pNZ8148 та їхні похідні, гени hasA, hasB, hasC, hasD та hasE	Одночасне вираження генів hasA і hasB	0,68	(de Oliveira та ін., 2016).
<i>Enterococcus faecalis</i> OGIRF	Гени для біосинтезу ГК, транспозон 916 insertional mutagenesis, плазмідні pAT19 та pPD41	Генетична модифікація, транспозонний мутагенез та використання плазмідних векторів	0,69	
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032 pJH183.2	Ген hasA з <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> , гени hasB, hasC, glmU, і vgb	Оптимізація умов культивування та вираження генів hasA і tuaD	До 1,3	(Hmar, Prasad, Jayaraman, & Ramachandra, 2014)
<i>Kluyveromyces lactis</i> .	Ген pm hasA з <i>Pasteurella multocida</i>	вираження гену hasA, оптимізація умов культивування	1,89	Gomes, Netto, Carvalho, & Parachin, 2019).
<i>Escherichia</i>	Гени hasA,	Генетичні	0,029	(Woo, Seong,

<i>coli</i>	tuaD, а також активація галактозного шляху	модифікації для підсилення біосинтезу UDP-глюкуронової кислоти	98 г/л	Lee, & Jang, 2019).
<i>Streptomyces albulus</i> CRM003	Ген hasA з <i>S. zooepidemicus</i>	Генетична модифікація та оптимізація умов культури	6,2	(Yoshimura, Shibata, Hamano, & Yamanaka, 2015)
<i>Bacillus subtilis</i> 3NA	Гени hasA, tuaD, gtaB, і gcaB з <i>S. zooepidemicus</i> та плазміди pTRG5, pDR111	Включення оптимальної RBS для гена tuaD	7	(Cerminati та ін., 2021)

Як видно з таблиці 1, поки одним з найперспективніших рекомбінантних продуцентів ГК можна назвати *Bacillus subtilis*, адже він синтезує найбільшу кількість цільового продукту на літр культуральної рідини і це за умови часу культивування 11 год. *B. subtilis* має статус GRAS, що гарантує можливість розробки продуктів, які не містять ендотоксинів, у промислових масштабах.

### ***Оптимізація мікробного одержання інших глікозаміногліканів***

**1. Альгінат.** Альгінат у косметиці володіє підтягуючими та моделюючими властивостями, покращує мікроциркуляцію крові, тонізує та освіжає шкіру, розгладжують зморшки. Зазвичай його одержують з бурих водоростей. Однак із змінами навколишнього середовища, такими як підвищення температури океану та збільшення кількості біотехнологічних застосувань альгінатів зі

специфічними властивостями, виникає потреба в більш надійних джерелах видобутку, які можна модифікувати, тому зараз активно розробляються біотехнологічні шляхи отримання цієї речовини.

Так, бактерія *Pseudomonas aeruginosa* здатна виробляти альгінат. Останні дослідження (El-Helow, Atalla, Sabra, & Lotfy, 2020) показують, що сульфат магнію, мікроелементи та перекис водню є важливими змінними, які позитивно впливають на синтез альгінату клітинами *Pseudomonas aerugi* FRD1.

Варто пам'ятати, що даний продуцент, це доволі патогенна бактерія, і її культивування в промислових масштабах має значний ризик, тому були проведені дослідження (Valentine, та ін., 2020), щоб створити непатогенний штам. Для цього, послідовно видалили п'ять ключових генів патогенності з хромосоми *P. aeruginosa*, у результаті чого отримав штам PGN5 без маркерів. Внутрішньочеревна ін'єкція мишам цього штаму призвела до 0% смертності, у той час як ін'єкція *P. aeruginosa* дикого типу призвела до 95% смертності. Це чудовий результат, що свідчить про те, що системна вірулентність PGN5 сильно ослаблена. Важливо підкреслити, що PGN5 виробляє досить велику кількість альгінату у відповідь на надмірну експресію MucE, активатора біосинтезу альгінату. Також, альгінат, який продукує PGN5, структурно ідентичний альгінату, який виробляє *P. aeruginosa* дикого типу, це вказує на те, що шлях біосинтезу альгінату залишився незмінним у цьому модифікованому штамі.

**2. Гепарин, гепарозан та гепарансульфат.** Для синтезу гепарину використовували рекомбінантні дріжджі *Pichia pastoris* (Zhang, та ін., 2022), що можуть виробляти гепарин з метанолу. Це дозволило утворити 2,08 г/л біоінженерного гепарину в культурах з періодичним підживленням.

Існують інші способи вироблення гепарину, зокрема в клітинах ссавців. Так, у дослідженні (Oduah, Linhardt, & Sharfstein, 2016) було використано клітини яєчників китайського хом'яка (СНО). Дані еукаріотичні клітини в даний час є одними з найбільш часто використовуваних фабрик для виробництва біологічних фармацевтичних препаратів завдяки своїм унікальним

властивостям, таким як міцність, безпека від потенційного вірусного зараження та легкість маніпуляцій. Ці клітини також вважаються сприятливими для біологічної інженерії гепарину, оскільки вони внутрішньо експресують більшість ферментів, залучених у шляху біосинтезу гепарину, за винятком двох, HS3ST1 і NDST2 (ферменти важливі для антикоагулянтних властивостей гепарину). Крім того, клітини CHO природним чином виробляють гепарансульфат (HS), GAG, подібний до гепарину.

Гепарозан природним чином синтезує *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN). Але для підвищення виходу цієї сполуки у дослідженні (Hu, та ін., 2022) було задіяно метаболічну інженерію, а саме:

1. Оптимізація біосинтезу прекурсорів: було проведено оптимізацію біосинтезу прекурсорів, таких як UDP-GlcA і UDP-GlcNAc, необхідних для синтезу гепарозану.

2. Експресія ферментів шляху синтезу гепарозану: Введено гени, що кодують ферменти для синтезу гепарозану, включаючи bsGalU і ecKfiD для UDP-GlcA і ecGlmM для UDP-GlcNAc.

3. Підвищення експресії ендогенних генів, що кодують ферменти синтезу гепарозану.

Дані маніпуляції дозволили підвищити рівень виходу гепарозану з 0,15 г/л до 1,29 г/л.

Також, одним з рекомбінантних продуцентів гепарозану може слугувати *Bacillus megaterium*. У статті (Williams, та ін., 2019) було проведено генетичну трансформацію бактерії *B. megaterium* MS941, введенням двох плазмід: одна містила ген T7 RNA Polymerase (pT7-RNAP), а інша містила ген PmHS2(отриманий з *Pasteurella multocida* і слугує для синтезу гепарозану). В результаті маніпуляцій вихід продукту становив 2.74 г/л.

Ще одним продуцентом гепарозану у дослідженні (Jin, та ін., 2016) слугував *Bacillus subtilis*, в котрого інтегрували гени синтаз, отримані з *Escherichia coli*. В результаті було отримано штамм, котрий здатний виробляти до 5,82 г/л гепарозану.

Узагальнені дані щодо продуцентів синтезу гепаринової групи ГАГ наведено в таблиці 3.

**Таблиця 3. Продуценти ГАГ та умови їх оптимізації для покращення синтезу цільового продукту**

Продуценти	Використані Плазмід/Гени	Умови та Оптимізації	Вихід (г/л)	Продукт	Джерело
<i>Pichia pastoris</i>	pRKN, pNZ8148, гени hasA, hasB, hasC, hasD, hasE	Культури з періодичним підживленням метанолом	2,08	Гепарин	(Zhang, та ін., 2022)
СНО* (клітини яєчників китайського хом'яка)	-	Генна інженерія спрямована на утворення ферментів HS3ST1 і NDST2	0,09	Гепарин	(Oduah, Linhardt, & Sharfstein, 2016)
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 ( <i>EcN</i> )	bsGalU, ecKfiD, ecGlmM -	Метаболічна інженерія: оптимізація біосинтезу прекурсорів, експресія ферментів, підвищення експресії генів	1,29	Гепарозан	(Hu, та ін., 2022)
<i>Bacillus</i>	pT7-RNAP,	Генетична	2,7	Гепарозан	(Willia

<i>megaterium</i>	PmHS2	трансформація, введення двох плазмід, експресія генів	4	зан	ms, та ін., 2019)
<i>Bacillus subtilis</i> A1645	Гени синтаз з <i>Escherichia coli</i> K5	Генетична модифікація, інтеграція генів синтаз, оптимізація	5,8 2	Гепаро зан	(Jin, та ін., 2016)

Примітка: \* - не являється прокаріотичним мікроорганізмом.

**3. Хондротоїн.** Вже в згаданому вище науковому джерелі (Jin, та ін., 2016) генетично модифікований *Bacillus subtilis* окрім синтезу гепарозану здатний був виробляти хондротоїн у кількості 5,22 г/л.

Інше дослідження (Zhou, та ін., 2018) з використанням того ж *Bacillus subtilis* показало, що можна отримати вихід хондротоїну у кількості до 7,15 г/л. Таких результатів вдалося досягти завдяки генній інженерії. Гени *tuaD*, *glmU*, *gtaB*, *glmM*, *glmS* і *kfoA* були ампліфіковані з геномної ДНК *B. subtilis* E168C.

Взагалі для виробництва хондротоїну переважно використовують *E. coli* K4, адже це найперший та найбільш вивчений мікроорганізм, котрий був залучений в промисловому виробництві цього глікозаміноглікану. Однак, дослідники (Couto, Rodrigues, & Rodrigues, 2022) помітили, що використання цієї бактерії має свої обмеження і проблеми, які включають:

1. Необхідність хімічної обробки: Для отримання хондротину з *E. coli* K4 необхідна хімічна дефруктозиляція та хімічна сульфуація, що ускладнює процес виробництва та може вплинути на якість продукту.

2. Низький вихід: У більшості випадків виходи хондротину, отриманого з *E. coli* K4, були низькими.

У зв'язку з цими обмеженнями, дослідники стараються знаходити альтернативні мікроорганізми для виробництва хондротину. Деякі з альтернативних продуцентів включають *E. coli* K5, *S. zooepidemicus*, *E. coli*

*BL21 (DE3)*, *B. subtilis*, *Corynebacterium glutamicum* i *E. coli K-12* (Badri, та ін., 2021; Badri, Williams, Linhardt, & Koffas, 2018).

**Післяферментаційні етапи у виробництві глікозаміногліканів.** Біосинтез це не єдиний етап в отриманні глікозаміногліканів, адже після завершення процесу культивування їх потрібно виділити з супернатанту та очистити від бактеріальних частинок. Це доволі важливий крок в отриманні якісного не імуногенного продукту, хоч разом з тим вартісний та складний (Sharma, Kataria, Sharma, & Singh, 2022; Rodriguez-Marquez, Arteaga-Marin, Rivas-Sánchez, Atrique-Hernández, & Castro-Muñoz, 2022).

Осадження гіалуронової кислоти відбувається аналогічно осаждению білка в присутності органічних розчинників. Суть процесу полягає в тому, що зниження діелектричної проникності водяної системи на користь системи органічного розчинника сприяє взаємодії макромолекул, що призводить до збільшення молекулярної маси цільового глікозаміноглікану і, відповідно, до його подальшого осаждению. І як свідчить джерело (Ucm, та ін., 2022) ізопропанол є кращим агентом для осаждению, а на лабораторному рівні можуть використовувати і холодний етанол.

В іншому дослідженні (Abbas Mohammed, & Niamah, 2022) автори теж осаджували ГК ізопропанолом, білки видаляли за допомогою 1% трихлороцтової кислоти, в подальшому отриману гіалуронову кислоту діалізували проти ультрачистої води (спеціально підготовлена вода зі зниженою мінералізацією) та ліофілізували, щоб отримати товарну форму.

У статті (Güngör та ін., 2019). був використаний наступний метод очищення ГК: після ферментації, клітинні залишки видалялися за допомогою 0.15% натрію додецилсульфату і в подальшому центрифугували, отриманий супернатант подавали на діалізну колонку з целюлозною мембраною 25 мм × 16 мм і типовою молекулярною масою відсікання 14000. Після цього колону на 5 днів лишали у розчині NaCl. Діалізат фільтрували за допомогою фільтра з ацетату целюлози 0,45 і 0,2 мкм і фільтра змішаних ефірів целюлози (8 мкм) і в

кінці осадили 96% етанол. В решті вдалося отримати 12 г/л гіалуронової кислоти, що є дуже високим показником.

Можна помітити що майже скрізь в згаданих дослідженнях для отримання гіалуронової кислоти з супернатанту використовують органічні розчинники, але це відносно дорого та може бути не вигідно в промислових масштабах, тому автори (Gözke та ін., 2017) розглядали електрофільтрацію – як альтернативний спосіб отримати очищену ГК. Було виявлено, що отриманий цільовий продукт таким чином зберіг свою молекулярну масу та структуру, а також вдалося збільшити кінцевий вихід продукту, якщо порівнювати зі звичайною фільтрацією.

Але не тільки гіалуронова кислота вимагає ретельного та багатоетапного очищення. Особливо важливо якісно очищати сульфатовані ГАГ через їхню складну структуру та чутливість до забруднень.

В дослідженні (D'ambrosio та ін., 2020). автори очищали хондротин сульфат від залишків фруктози. Так для їх очищення спочатку супернатант мікрофільтрували через 0,65 мкм Sartopure PP2 micicap і обробляли 10 ОД/л протеаз з *Aspergillus oryzae*, отриманий розчин подавали на діафільтрацію за допомогою тангенціальної фільтрації на Uniflux-10 потім гідролізували та піддавали другій ультрафільтрації на мембранах 5 кДа, після чого проводили осадження етанолом і подальше очищення за допомогою слабкої аніонної обмінної хроматографії на смолі DEAE.

А в статті (Badri, та ін., 2021) автори осаджували хондротин сульфат етанолом, осад висушували та повторно розчиняли в стерильній воді, а далі додавали хондротиназу для гідролізу ГАГ. Потім розчин пропускали через колонку 3 кДа, фільтрат збирали та ліофілізували.

**Нормативне забезпечення.** Одним із важливих аспектів впровадження ГАГ в промислове виробництво косметичних засобів є дотримання вимог нормативного забезпечення, а саме міжнародних та національних стандартів.

В Україні виробництво та обіг глікозаміногліканів для застосування в косметичній галузі буде регулюватися Технічним регламент про косметичну

продукцію - гармонізовано з Регламентом ЄС; котрий набуває з 03.08.2024. На даний момент часу більшість національних стандартів що регулювали якість косметичної продукції скасовано.

Основним документом, що регулює виробництво ГАГ для косметичної галузі в ЄС, є Регламент Європейського парламенту та Ради Європейського Союзу No 1223/2009 від 30 листопада 2009 року «про косметичні засоби» (Cosmetic Regulation 1223/2009, 2009). Він містить: перелік дозволених ГАГ; вимоги до маркування, пакування, зберігання, процедури оцінки безпеки інгредієнтів. Україна намагається гармонізувати своє законодавство відповідно до законодавства ЄС, тому вводить аналогічний документ - Технічний регламент на косметичну продукцію, котрий набуває чинності з 03.08.2024 р (ТНПК, 2024). Він розроблений на основі згаданого вище Регламент No 1223/2009 ЄС, з метою забезпечення функціонування внутрішнього ринку та високого рівня захисту здоров'я людини.

Відповідно до Регламенту ЄС No1223/2009 про косметичну продукцію, до складу косметичних засобів дозволяється включати такі глікозаміноглікани:

- Гіалуронова кислота та її солі - натрію гіалуронат, калію гіалуронат. Дозволені до вмісту 100%.
- Хондроїтин сульфат - дозволений до вмісту 5%.
- Гепарин та гепаринові похідні не включені до переліку дозволених до використання речовин в косметичній продукції згідно Регламенту ЄС No1223/2009.

Однак гепарин та його похідні можуть входити до складу окремих видів косметичної продукції (креми, гелі) для місцевого застосування з метою зменшення проявів куперозу, попередження венозних тромбів тощо. Але такі засоби вже класифікуються швидше як косметичні засоби з терапевтичними властивостями і на них поширюються додаткові вимоги:

1. Обов'язкова оцінка безпеки готового продукту, включаючи дослідження потенційного системного впливу інгредієнтів.

2. Попереджувальне маркування про можливі побічні ефекти та застереження щодо використання.
3. Обмеження щодо вмісту діючих речовин
4. Спеціальні вимоги до упаковки (тюбики з обмеженою дозою).
5. Дерматологічні випробування переносимості.
6. Обов'язкове зазначення терміну придатності після відкриття.

Також в ЄС діє низка стандартів серій ISO 22716, 22717, 22718, 29621 щодо належної виробничої практики косметичної продукції. А саме:

1. ISO 22716:2007 “Косметична продукція. Належна виробнича практика (GMP). Настанови щодо належної виробничої практики” - основний стандарт серії, що встановлює вимоги до GMP (ISO 22716:2007).

2. ISO 22717:2015 “Косметична продукція. Мікробіологічні випробування. Виявлення *Pseudomonas aeruginosa*” - визначає методи виявлення мікробіологічних забруднень синьогнійної палички (ISO 22717:2015).

3. ISO 22718:2015 “Косметична продукція. Мікробіологічні випробування. Виявлення, *Staphylococcus aureus*” - методи аналізу, підрахунку та ви значення золотистого стафілококу (ISO 22718:2015).

4. ISO 29621:2017 “Косметична продукція. Мікробіологічні випробування. Настанови щодо оцінювання ризиків та визначення мікробіологічно низькоризикової продукції” - методи виявлення патогенних мікроорганізмів (ISO 29621:2017).

В Україні діють 2 гармонізовані стандарти ISO щодо GMP та мікробіологічного контролю косметичного виробництва. ДСТУ EN ISO 22716:2015 “Косметика. Належна виробнича практика (GMP). Настанови з належної виробничої практики (EN ISO 22716:2007, IDT)” - гармонізований з основним стандартом ISO 22716:2007 щодо GMP та ДСТУ EN ISO 29621:2016 "Косметика. Мікробіологія. Настанова з оцінювання ризику та ідентифікації продуктів із низьким рівнем мікробіологічного ризику” -

гармонізований за методами виявлення патогенних мікроорганізмів з . ISO 29621:2010 (даний стандарт вже не діє на території ЄС) (ДСТУ EN ISO 22716:2015; ДСТУ EN ISO 29621:2016).

Також, існують спеціальні стандарти та фармакопейні статті, що встановлюють вимоги до якості саме гіалуронової кислоти. У Європейській фармакопеї є окрема монографія "Hyaluronic acid", що містить вимоги до гіалуронової кислоти для фармацевтичного та косметичного застосування за показниками: опис, розчинність, ідентифікація, вміст води, важкі метали, мікробне число тощо (Ph. Eur., 2022). В США діє стандарт United States Pharmacopeia-National Formulary <1276> - "Hyaluronan" з аналогічними вимогами якості (USP-NF, 2023). В Українській Державній фармакопеї відсутня окрема стаття або монографія, присвячена безпосередньо гіалуроновій кислоті, але є загальна стаття «Косметичні засоби», яка містить вимоги до косметичної продукції за мікробіологічними та токсикологічними показниками (ДФУ 2-е вид., 2015). Окремі вимоги до гіалуронової кислоти як інгредієнта косметичних засобів в Україні встановлені в Технічному регламенті про косметичну продукцію, згаданому раніше.

Основним регулятором косметичної продукції в США є Управління з контролю за продуктами та ліками (FDA). Згідно Закону про федеральну продовольчу, лікарську та косметичну продукцію, виробники несуть відповідальність за безпечність та правдиве маркування косметичних засобів.

FDA встановлює вимоги до якості окремих інгредієнтів, в т.ч. гіалуронової кислоти фармацевтичного та косметичного використання. Також діють стандарти серії ISO 22716 щодо GMP косметичного виробництва. Отже, у США регулювання ГАГ для косметики менш формалізоване, але FDA встановлює вимоги до безпеки та якості.

Основним регулятором косметичної продукції в Україні є Державна служба України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів (Держпродспоживслужба). На відміну від США, в Україні регулювання глікозаміногліканів для застосування в косметології є більш формалізованим і

ґрунтується на вимогах вищезгаданого Технічного регламенту про косметичну продукцію, гармонізованого з європейським законодавством.

**Висновки.** У даному огляді було розглянуто сучасні способи оптимізації отримання глікозаміногліканів для косметичного застосування. На сьогоднішній день, найоптимальнішим способом отримання ГАГ є мікробний синтез, але й він має певні недоліки, котрі пов'язані з патогенністю природних продуцентів, тому багато наукових статей присвячена генетичному конструюванню нових синтетиків глікозаміногліканів.

Отже, найоптимальнішим способом та продуцентом для одержання гіалуронової кислоти є мікробіологічний синтез з використанням *Bacillus subtilis 3NA*. Вихід ГК становить 7 г/л, а час культивування 11 год.

Як можна помітити не було проаналізовано жодного вітчизняного наукового видання. Це пов'язано з тим, що в Україні, на жаль, недостатньо наукових праць та досліджень з даної тематики. дослідження стосуються виходу лише гіалуронової кислоти, як найпопулярнішого та найвідомішого представника глікозаміногліканів і це доволі негативна тенденція, адже не вдалося знайти жодних джерел за останні десять років, що стосуються мікробного одержання гепарину, хондротейну чи гепарозану – доволі популярних речовин в косметології. Відверто кажучи, ситуація з гіалуроновою кислотою теж не набагато краща, потрібних наукових джерел від вітчизняних вчених занадто мало, а ті котрі є в основному оглядові роботи на закордонні дослідження (Павлова, Кричковська, & Омельченко, 2013; Лупина, & Волошина, 2014; Лич, Угрин, & Волошина, 2019).

Ці фактори вказують на необхідність спільних зусиль влади, бізнесу та наукової спільноти для розвитку вітчизняної біотехнології. Тим паче, що попит на косметичну продукцію з глікозаміногліканами в Україна є.

## Література

ДСТУ EN ISO 22716:2015 Косметика. Належна виробнича практика (GMP).  
Настанови з належної виробничої практики (EN ISO 22716:2007, IDT)

Посилання: ([https://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id\\_doc=73831](https://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=73831))

ДСТУ EN ISO 29621:2016 "Косметика. Мікробіологія. Настанова з оцінювання ризику та ідентифікації продуктів із низьким рівнем мікробіологічного ризику (EN ISO 29621:2011, IDT; ISO 29621:2010, IDT)"

Посилання: ([https://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id\\_doc=90261](https://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=90261))

ДФУ 2-е вид. (2015). Державна Фармакопея України: в 3 т. - 2-е вид. - Харків: ДП "Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів", 2015. -Т. 1.-1128 с.

Лич, І. В., Угрин, А. О., Волошина, І. М. (2019). Гіалуронова кислота: біосинтез та використання. *Ukrainian biopharmaceutical journal*, (59): 6-13.

Луцина, Т., Волошина, О. С. (2014). Біотехнологічний спосіб отримання гіалуронової кислоти. Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті : програма і матеріали 80 міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів, 10–11 квітня – К.: НУХТ, 2014. – Ч. 1. – С. 625-626.

Павлова, О.О., Кричковська, Л.В., Омельченко, В.С. (2013). Дослідження синтезу гіалуронової кислоти мікробіологічним способом. Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут», 301.

ТНПК (2024). Технічний регламент про косметичну продукцію Посилання: (<https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/65-2021-%D0%BF#Text>)

Abbas Mohammed, A., Niamah, A. K. (2022). Production and Optimization of Hyaluronic Acid Extracted from *Streptococcus thermophilus* Isolates. *Arch. Razi Inst*, 77(6), 2395–2405. doi: 10.22092/ARI.2022.358612.2262

Almotrefi, N. A., Gangwani, S., Alshahrani, N. A., Ibrahim, W. M. (2023). Psychological Determinants of Saudi Women's Purchase Intention of International Brand Cosmetics. *Resmilitaris*, 13(2), 3358-3371.

Amado, I. R., Vázquez, J. A., Pastrana, L., Teixeira, J. A. (2016). Cheese whey: A cost-effective alternative for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. *Food Chem.*, 198, 54–61. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.11.062.

Awofiranye, A. E., Hudson, J., Tithi, A. D., Linhardt, R. J., Vongsangnak, W., Koffas, M. A. G. (2022). Chondroitin Sulfate and Its Derivatives: A Review of Microbial and Other Production Methods. *Fermentation*, 8(7), 323. doi: 10.3390/fermentation8070323.

Badri, A., Williams, A., Awofiranye, A., Datta, P., Xia, K., He, W., ..., Koffas, M. A. G. (2021). Complete biosynthesis of a sulfated chondroitin in *Escherichia coli*. *Nat. Commun.*, 12(1), 1389. doi: 10.1038/s41467-021-21692-5.

Badri, A., Williams, A., Linhardt, R. J., Koffas, M. A. (2018). The road to animal-free glycosaminoglycan production: current efforts and bottlenecks. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 53, 85–92. doi: 10.1016/j.copbio.2017.12.018.

Balbinot-Alfaro, E., Rocha, M. D., Alfaro, A. D. T., Martins, V. G. (2021). Properties, bioactive potential and extraction processes of glycosaminoglycans: An overview. *Ciência Rural*, 51. doi: 10.1590/0103-8478cr20200821.

Benedini, L. J., Santana, M. H. (2013). Effects of soy peptone on the inoculum preparation of *Streptococcus zooepidemicus* for production of hyaluronic acid. *Bioresour. Technol.*, 130, 798–800. doi: 10.1016/j.biortech.2012.12.161.

Cai, C. M., Zhang, T., Kumar, R., Wyman, C. E. (2014). Integrated furfural production as a renewable fuel and chemical platform from lignocellulosic biomass. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 89(1), 2-10. doi: 10.1002/jctb.4168.

Cerminati, S., Leroux, M., Anselmi, P., Peirú, S., Alonso, J. C., Priem, B., Menzella, H. G. (2021). Low cost and sustainable hyaluronic acid production in a manufacturing platform based on *Bacillus subtilis* 3NA strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 105(8), 3075–3086. doi:10.1007/s00253-021-11246-6.

CGMP (2016). Current Good Manufacturing Practice Regulations Посилання: (<https://www.fda.gov/drugs/pharmaceutical-quality-resources/current-good-manufacturing-practice-cgmp-regulations>)

Cosmetic Regulation 1223/2009 (2009). Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products Посилання: (<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32009R1223>)

Couto, M. R., Rodrigues, J. L., Rodrigues, L. R. (2022). Heterologous production of chondroitin. *Biotechnol Rep (Amst)*, 33, e00710. doi: 10.1016/j.btre.2022.e00710.

Cristiano, L., & Guagni, M. (2022). Zoocuticals and Cosmetic Ingredients Derived from Animals. *Cosmetics*, 9(1), 13. doi: 10.3390/cosmetics9010013.

D'ambrosio, S., Alfano, A., Cassese, E., Restaino, O. F., Barbuto Ferraiuolo, S., Finamore, R., ..., Cimini, D. (2020). Production and purification of higher molecular weight chondroitin by metabolically engineered *Escherichia coli* K4 strains. *Sci. Rep.*, 10(1), 13200. doi: 10.1038/s41598-020-70027-9.

de Oliveira, J. D., Carvalho, L. S., Gomes, A. M., Queiroz, L. R., Magalhães, B. S., Parachin, N. S. (2016). Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms. *Microb. Cell Factories*, 15(1), 119. doi.: 10.1186/s12934-016-0517-4.

El-Helow, E. R., Atalla, R. G., Sabra, W. A., Lotfy, W. A. (2020). Kinetic studies on the expression of alginate and extracellular proteins by *Pseudomonas aeruginosa* FRD1 and PAO1. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 66(1), 15–23. doi: 10.2323/jgam.2019.04.003

GMP (2020). СТ-Н МОЗУ 42-4.9:2020 «Лікарські засоби. Належна виробнича практика. Спеціальні правила належної виробничої практики лікарських засобів передової терапії» Посилання: ([https://www.dls.gov.ua/wp-content/uploads/2020/05/%D0%9D%D0%B0%D1%81%D1%82%D0%B0%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B0-%D0%A1%D0%A2-%D0%9D-%D0%9C%D0%9E%D0%97%D0%A3-42-4.0\\_2020.pdf](https://www.dls.gov.ua/wp-content/uploads/2020/05/%D0%9D%D0%B0%D1%81%D1%82%D0%B0%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B0-%D0%A1%D0%A2-%D0%9D-%D0%9C%D0%9E%D0%97%D0%A3-42-4.0_2020.pdf))

Gomes, A. M., C M Netto, J. H., Carvalho, L. S., Parachin, N. S. (2019). Heterologous Hyaluronic Acid Production in *Kluyveromyces lactis*. *Microorganisms*, 7(9), 294. doi: 10.3390/microorganisms7090294.

Gözke, G., Kirschhöfer, F., Pechtl, C., Brenner-Weiss, G., Krumov, N. V., Obst, U., Posten, C. (2017). Electrofiltration improves dead-end filtration of hyaluronic acid and presents an alternative downstream processing step that overcomes technological challenges of conventional methods. *Eng. Life Sci.*, 17(9), 970-975. doi: 10.1002/elsc.201600236.

Gottschalk, J., Elling, L. (2021). Current state on the enzymatic synthesis of glycosaminoglycans. *Curr Opin Chem Biol.*, 61, 71–80. doi: 10.1016/j.cbpa.2020.09.008.

Güngör, G., Gedikli, S., Toptaş, Y., Akgün, D. E., Demirbilek, M., Yazıhan, N., ..., Çabuk, A. (2019). Bacterial hyaluronic acid production through an alternative extraction method and its characterization. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 94(6), 1843-1852. doi: 10.1002/jctb.5957.

Hmar, R. V., Prasad, S. B., Jayaraman, G., Ramachandran, K. B. (2014). Chromosomal integration of hyaluronic acid synthesis (has) genes enhances the molecular weight of hyaluronan produced in *Lactococcus lactis*. *Biotechnol. J.*, 9(12), 1554-1564. doi: 10.1002/biot.201400215.

Hu, S., Zhao, L., Hu, L., Xi, X., Zhang, Y., Wang, ..., Kang, Z. (2022). Engineering the probiotic bacterium *Escherichia coli* Nissle 1917 as an efficient cell factory for heparosan biosynthesis. *Enzyme Microb. Technol.*, 158, 110038. doi: 10.1016/j.enzmictec.2022.110038.

ISO 22716:2007 “Косметична продукція. Належна виробнича практика (GMP). Настанови щодо належної виробничої практики”. Посилання: (<https://www.iso.org/standard/36437.html>)

ISO 22717:2015 “Косметична продукція. Мікробіологія. Виявлення *Pseudomonas aeruginosa*”. Посилання: (<https://www.iso.org/standard/68312.html>)

ISO 22718:2015 “Косметична продукція. Мікробіологія. Виявлення *Staphylococcus aureus*”. Посилання: (<https://www.iso.org/standard/68313.html>)

ISO 29621:2017 “Косметична продукція. Мікробіологія. Настанови щодо оцінювання ризиків та визначення мікробіологічно низькоризикової продукції”  
Посилання: (<https://www.iso.org/standard/68310.html> )

Jin, P., Zhang, L., Yuan, P., Kang, Z., Du, G., Chen, J. (2016). Efficient biosynthesis of polysaccharides chondroitin and heparosan by metabolically engineered *Bacillus subtilis*. *Carbohydr. Polym.*, 140, 424–432. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.12.065.

Jin, W., Zhang, F., Linhardt, R. J. (2021). Bioengineered production of glycosaminoglycans and their analogues. *Syst. Appl. Microbiol.*, 1, 123-130. doi: 10.1007/s43393-020-00011-x.

Lee, J., Kwon, K. H. (2022). Why is generation MZ passionate about good consumption of K-cosmetics amid the COVID-19 pandemic? *J. Cosmet. Dermatol.*, 21(8), 3208–3218. doi: 10.1111/jocd.14859.

Lu, J. F., Zhu, Y., Sun, H. L., Liang, S., Leng, F. F., Li, H. Y. (2016). Highly efficient production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* R42 derived from heterologous expression of bacterial haemoglobin and mutant selection. *Lett. Appl. Microbiol.*, 62(4), 316–322. doi: 10.1111/lam.12546.

Menezes, R., Vincent, R., Osorno, L., Hu, P., Arinze, T. L. (2023). Biomaterials and tissue engineering approaches using glycosaminoglycans for tissue repair: Lessons learned from the native extracellular matrix. *Acta biomaterialia*, 163, 210–227. doi: 10.1016/j.actbio.2022.09.064.

Mendoza-Muñoz, N., Leyva-Gómez, G., Piñón-Segundo, E., Zambrano-Zaragoza, M. L., Quintanar-Guerrero, D., Del Prado Audelo, M. L., Urbán-Morlán, Z. (2023). Trends in biopolymer science applied to cosmetics. *Int. J. Cosmet. Sci.*, 45(6), 699–724. doi: 10.1111/ics.12880.

Möller, S., Theiß, J., Deinert, T. I., Golat, K., Heinze, J., Niemeyer, D., ..., Bogner, E. (2022). High-sulfated glycosaminoglycans prevent Coronavirus replication. *Viruses*, 14(2), 413. doi: 10.3390/v14020413.

Oduah, E. I., Linhardt, R. J., Sharfstein, S. T. (2016). Heparin: Past, Present, and Future. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 9(3), 38. doi: 10.3390/ph9030038.

Oliveira, A. H., Ogrodowski, C. C., de Macedo, A. C., Santana, M. H., Gonçalves, L. R. (2014). Cashew apple juice as microbial cultivation medium for non-immunogenic hyaluronic acid production. *Braz. J. Microbiol.*, 44(4), 1097–1104. doi: 10.1590/S1517-83822014005000017.

Ozcan, A., Germec, M., Turhan, I. (2022). Optimization and kinetic modeling of media composition for hyaluronic acid production from carob extract with *Streptococcus zooepidemicus*. *Bioprocess Biosyst Eng.*, 45(12), 2019–2029. doi: 10.1007/s00449-022-02806-9.

Pan, N. C., Pereira, H. C. B., da Silva, M. L. C., Vasconcelos, A. F. D., Celligoi, M. A. P. C. (2017). Improvement Production of Hyaluronic Acid by *Streptococcus zooepidemicus* in Sugarcane Molasses. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 182(1), 276–293. doi: 10.1007/s12010-016-2326-y.

Ph. Eur. (2022). EUROPEAN PHARMACOPOEIA Посилання: (<https://pheur.edqm.eu/home> )

Radhouani, H., Correia, S., Gonçalves, C., Reis, R. L., Oliveira, J. M. (2021). Glycosaminoglycans. In Polysaccharides of Microbial Origin: Biomedical Applications. *Mater. Sci. Eng. R Rep. MAT SCI ENG R*. 140. 100543. doi: 10.1016/j.mser.2020.100543.

Rathod, S., Mali, S., Shinde, N., Aloorkar, N. (2020). Cosmeceuticals and Beauty Care Products: Current trends with future prospects. *Research J. Topical and Cosmetic Sci.*, 11(1):45-51. doi: 10.5958/2321-5844.2020.00008.4

Rawat, P. S., Seyed Hameed, A. S., Meng, X., Liu, W. (2022). Utilization of glycosaminoglycans by the human gut microbiota: participating bacteria and their enzymatic machineries. *Gut Microbes*, 14(1), 2068367. doi: 10.1080/19490976.2022.2068367.

Rodriguez-Marquez, C. D., Arteaga-Marin, S., Rivas-Sánchez, A., Autrique-Hernández, R., Castro-Muñoz, R. (2022). A Review on Current Strategies for Extraction and Purification of Hyaluronic Acid. *Int. J. Mol. Sci.*, 23(11), 6038. doi: 10.3390/ijms23116038.

Salvador Ferreira, M., Magalhães, C., Sousa Lobo, J. M., Almeida, I. F. (2020). Trending Anti-Aging Peptides. *Cosmetics*, 7(4), 91. doi: 10.3390/cosmetics7040091.

Sahu, B., Shrama, D. D., Jayakumar, G. C., Madhan, B., Zameer, F. (2022). A review on an imperative by-product: Glycosaminoglycans-A Holistic approach. *Carbohydr. Polym.*, 100275. doi: 10.1016/j.carpta.2022.100275.

Segars, K. L., Trinkaus-Randall, V. (2023). Glycosaminoglycans: Roles in wound healing, formation of corneal constructs and synthetic corneas. *Ocul Surf*, 30, 85-91. doi: 10.1016/j.jtos.2023.08.008.

Sharma, R., Kataria, A., Sharma, S. and Singh, B. (2022), Structural characterisation, biological activities and pharmacological potential of glycosaminoglycans and oligosaccharides: a review. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 57: 4-15. doi: 10.1111/ijfs.15379.

Ucm, R., Aem, M., Lhb, Z., Kumar, V., Taherzadeh, M. J., Garlapati, V. K., Chandel, A. K. (2022). Comprehensive review on biotechnological production of hyaluronic acid: status, innovation, market and applications. *Bioengineered*, 13(4), 9645-9661. doi: 10.1080/21655979.2022.2057760.

USP-NF (2023). United States Pharmacopeia-National Formulary <1276> «Hyaluronan»  
Посилання:  
(<https://login.usp.org/cas/login?service=https%3A%2F%2Fonline.uspnf.com%2Fcas%2Flogin>)

Vázquez, J., Pastrana, L., Piñeiro, C., Teixeira, J., Pérez-Martín, R., Amado, I. (2015). Production of Hyaluronic Acid by *Streptococcus zooepidemicus* on Protein Substrates Obtained from Scyliorhinus canicula Discards. *Marine Drugs*, 13(10), 6537–6549. doi. 10.3390/md13106537.

Valentine, M. E., Kirby, B. D., Withers, T. R., Johnson, S. L., Long, T. E., Hao, Y., ..., Yu, H. D. (2020). Generation of a highly attenuated strain of *Pseudomonas aeruginosa* for commercial production of alginate. *Microb. Biotechnol.*, 13(1), 162–175. doi: 10.1111/1751-7915.13411.

Wang, J., He, W., Wang, T., Li, M., Li, X. (2021). Sucrose-modified iron nanoparticles for highly efficient microbial production of hyaluronic acid by

*Streptococcus zooepidemicus*. *Colloids Surf. B.*, 205, 111854. doi: 10.1016/j.colsurfb.2021.111854.

Wieboldt, R., Läubli, H. (2022). Glycosaminoglycans in cancer therapy. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 322(6), 1187-1200. doi: 10.1152/ajpcell.00063.2022.

Williams, A., Gedeon, K. S., Vaidyanathan, D., Yu, Y., Collins, C. H., Dordick, J. S., Linhardt, R. J., Koffas, M. A. G. (2019). Metabolic engineering of *Bacillus megaterium* for heparosan biosynthesis using *Pasteurella multocida* heparosan synthase, PmHS2. *Microb. Cell Factories*, 18(1), 132. doi: 10.1186/s12934-019-1187-9.

Woo, J. E., Seong, H. J., Lee, S. Y., Jang, Y. S. (2019). Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for the Production of Hyaluronic Acid From Glucose and Galactose. *Front. bioeng. biotechnol.*, 7, 351. doi: 10.3389/fbioe.2019.00351.

Yoshimura, T., Shibata, N., Hamano, Y., & Yamanaka, K. (2015). Heterologous Production of Hyaluronic Acid in an  $\epsilon$ -Poly-L-Lysine Producer, *Streptomyces albulus*. *Appl Environ. Microbiol.*, 81(11), 3631–3640. doi: 10.1128/AEM.00269-15.

Zhou, Z., Li, Q., Huang, H., Wang, H., Wang, Y., Du, G., Chen, J., Kang, Z. (2018). A microbial-enzymatic strategy for producing chondroitin sulfate glycosaminoglycans. *Biotechnol. Bioeng.*, 115(6), 1561–1570. doi: 10.1002/bit.26577.

Zhang, Y., Wang, Y., Zhou, Z., Wang, P., Xi, X., Hu, S., ... & Kang, Z. (2022). Synthesis of bioengineered heparin by recombinant yeast *Pichia pastoris*. *Green Chem.*, 24(8), 3180-3. doi: 10.1039/D1GC04672A.