

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій  
Кафедра біотехнології, шкіри та хутра

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

**на тему**

«Технологія одержання колагену біомедичного призначення  
методом кислотного гідролізу»

Рівень вищої освіти другий (магістерський)

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

Освітня програма Біотехнологія високомолекулярних сполук

Виконала: студентка групи МгЗБТ-22

Харченко Є. В.

Науковий керівник: к.т.н., доц. Охмат О.А.

Рецензент: д.т.н., проф. Андреева О.А.

Київ 2023

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

|                     |   |
|---------------------|---|
| Факультет           | <u>хімічних та біофармацевтичних технологій</u> |
| Кафедра             | <u>біотехнології, шкіри та хутра</u>            |
| Рівень вищої освіти | <u>другий (магістерський)</u>                   |
| Спеціальність       | <u>162 Біотехнології та біоінженерія</u>        |
| Освітня програма    | <u>Біотехнологія високомолекулярних сполук</u>  |

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Завідувач кафедри БШХ

\_\_\_\_\_ Олена МОКРОУСОВА

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2023 р.

**ЗАВДАННЯ  
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ СТУДЕНТУ  
Харченко Єлизаветі Вікторівні**

1. Тема кваліфікаційної роботи: Технологія одержання колагену біомедичного призначення методом кислотного гідролізу

Науковий керівник роботи Охмат Олена Анатоліївна, к.т.н., доц.  
затверджені наказом КНУТД від «12» вересня 2023 року №210-уч.

2. Вихідні дані до кваліфікаційної роботи: завдання на кваліфікаційну роботу; наукова література щодо властивостей колагену та його препаратів, методів їх отримання; матеріали науково-дослідної праткики, переддипломної практики.

3. Зміст кваліфікаційної роботи: вступ, огляд літератури, технологічна частина, контроль якості, висновки, список використаних джерел, додатки.

4. Дата видачі завдання 12.09.2023 р.

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

| № з/п | Назва етапу кваліфікаційної роботи   | Орієнтовний терміни виконання | Примітка про виконання |
|-------|--|-------------------------------|------------------------|
| 1     | Вступ  |                               |                        |
| 2     | Розділ 1 Огляд літератури  |                               |                        |
| 3     | Розділ 2 Технологічна частина  |                               |                        |
| 4     | Розділ 3 Контроль якості   |                               |                        |
| 5     | Висновки   |                               |                        |
| 6     | Оформлення кваліфікаційної роботи (чистовий варіант)   |                               |                        |
| 7     | Подача кваліфікаційної роботи науковому керівнику для відгуку  |                               |                        |
| 8     | Подача кваліфікаційної роботи для рецензування (за 14 днів до захисту)                                       |                               |                        |
| 9     | Перевірка кваліфікаційної роботи на наявність ознак плагіату та текстових співпадінь (за 10 днів до захисту) |                               |                        |
| 10    | Подання кваліфікаційної роботи на підпис завідувачу кафедри (за 7 днів до захисту)                           |                               |                        |

З завданням ознайомлений:

Студентка \_\_\_\_\_ Єлизавета ХАРЧЕНКО

Науковий керівник \_\_\_\_\_ Олена ОХМАТ

## ЗМІСТ

|  |           |
|--|-----------|
| <b>ВСТУП.....</b>  | <b>8</b>  |
| <b>РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....</b>   | <b>11</b> |
| 1.1 Загальні відомості про колаген.....  | 11        |
| 1.1.1 Основні характеристики колагену та його елементарний склад.....                      | 12        |
| 1.1.2 Будова та особливості структури колагену .....                                       | 12        |
| 1.1.3 Основні типи колагену .....  | 13        |
| 1.1.4 Основні методи отримання колагену .....  | 14        |
| 1.2 Галузі застосування колагену та його препаратів.....                                   | 17        |
| 1.2.1 Використання колагену у медичній галузі.....   | 17        |
| 1.2.2 Використання колагену в харчовій промисловості.....                                  | 18        |
| 1.2.3 Використання колагену у ветеринарії .....  | 19        |
| 1.2.4 Використання колагену в косметичній галузі .....                                     | 19        |
| Висновки до розділу 1 .....  | 20        |
| <b>РОЗДІЛ 2 ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА.....</b>  | <b>21</b> |
| 2.1 Аналіз ринку біомедичних засобів, що містять колаген.....                              | 21        |
| 2.2 Характеристика цільового продукту.....   | 26        |
| 2.3 Вибір сировини для отримання колагену біомедичного призначення.....                    | 29        |
| 2.4 Вибір та обґрунтування технології отримання колагену методом кислотного гідролізу..... | 31        |
| 2.5 Технологічна схема отримання колагену .....  | 33        |
| 2.6 Вибір обладнання для реалізації технології .....                                       | 39        |
| Висновки до розділу 2 .....  | 45        |
| <b>РОЗДІЛ 3 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ.....</b>   | <b>47</b> |
| 3.1 Контроль чистоти приміщень виробництва .....   | 47        |
| 3.2 Контроль персоналу.....  | 48        |
| 3.3 Вхідний контроль сировини тваринного походження .....                                  | 48        |
| 3.4 Визначення амінокислотного складу колагену.....  | 49        |
| 3.5 Мікробіологічний контроль цільового продукту.....                                      | 50        |

|  |           |
|--|-----------|
|  | 5         |
| Висновки до розділу 3 .....                | 50        |
| <b>ВИСНОВКИ .....</b>                      | <b>51</b> |
| <b>СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....</b> | <b>52</b> |
| <b>ДОДАТКИ .....</b>                       | <b>57</b> |

## АНОТАЦІЯ

**Єлизавета ХАРЧЕНКО. Технологія одержання колагену біомедичного призначення методом кислотного гідролізу.**

Кваліфікаційна робота за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія». – Київський національний університет технологій та дизайну, Київ, 2023 рік. – Рукопис.

Кваліфікаційну роботу присвячено отриманню колагену біомедичного призначення. Для реалізації технології запропоновано використання методу кислотного гідролізу. Проведено аналіз ринку біомедичних препаратів, що містять колаген. У кваліфікаційній роботі обґрунтовано технологію виробництва колагену. Запропоновано використання ферментного препарату мікробного походження на основі штаму *Bacillus subtilis* BLBc 11 для зневолошування сировини. Обґрунтовано вибір технологічного обладнання для реалізації технології. Визначено етапи контролю на виробництві.

*Ключові слова: колаген, екстрагування, кислотний гідроліз, ферментативне зневолошування, якість.*

## ABSTRACT

**Yelyzaveta Kharchenko. Technology of the biomedical collagen obtaining by acid hydrolysis.**

Qualification work in the specialty 162 "Biotechnology and bioengineering." – Kyiv National University of Technologies and Design, Kyiv, 2023 – Manuscript.

The qualification work is devoted to the production of collagen for biomedical purposes. To implement the technology, the use of the acid hydrolysis method is proposed. The market analysis of biomedical products containing collagen is carried out. The qualification work substantiates the technology of collagen production. The use of an enzyme preparation of microbial origin based on the *Bacillus subtilis* BLBc 11 strain for dehydration of raw materials is proposed. The choice of technological equipment for the implementation of the technology is substantiated. The stages of production control are determined.

*Keywords: collagen, extraction, acid hydrolysis, enzymatic unhairing, quality.*

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Колаген – це білок, що складається з амінокислот і є основним компонентом більшості тканин у тілі людини, таких як кістки, суглоби, хрящі, шкіра, судини тощо. Якщо колаген не виробляється в достатній кількості, то це може призвести до різних захворювань і проблем зі здоров'ям.

В останні роки спостерігається тенденція зростання світового ринку препаратів колагену. Зростання обумовлене розширенням галузей використання продуктів, що вміщують у своєму складі колаген.

Не виключенням є і галузь біомедицини, яка охоплює такі аспекти, як лікування ран, виразок або опіків, відновлення тканин, лікування остеоартриту, хірургію, імплантацію тощо. Застосування знайшли колагенвмісні продукти у вигляді порошків, гелів, мазей, волокон, пов'язок, плівок, губок, ниток, труб, шовного матеріалу тощо. Колагенвмісні гелі та губки використовують для прискорення загоювання раневих поверхонь через регенерацію епітеліальних тканин. В офтальмології застосовують колагенові екрани як систему доставки активних фармацевтичних інгредієнтів. Перспективним вважають і використання колагену при трансплантації шкіри та можливості створення «платформи» для росту нової тканини на ушкодженій ділянці. Широкою є практика застосування колагену при імплантації у стоматології та хірургії, створенні штучних суглобів та клапанів. Досліджується можливість застосування колагену для зменшення болю у хворих з ревматоїдним артритом. У дослідженні, опублікованому в журналі «Nature Materials» у 2020 році, доведена доцільність використання колагенових гідрогелів для регенерації кісткової тканини та лікування остеопорозу.

Постійний інтерес до застосування препаратів колагену для біомедичних цілей заснований на біосумісності препаратів та тканин організму людини.

Технологія виробництва колагену є привабливою з комерційної точки зору завдяки особливостям технології отримання бажаного продукту. Часто колаген отримують з вторинних продуктів м'ясопереробної та рибної



промисловості. Тому комерційний потенціал виробництва колагену є безперечним.

**Мета роботи** – вивчення можливості застосування технології кислотного гідролізу для отримання колагену біомедичного призначення.

**Наукова новизна** – використання на стадії зневолошування сировини тваринного походження лужної протеази мікробного походження, отриманої при культивуванні штаму *Bacillus subtilis* BLBc 11.

**Об'єкт дослідження** – технологія отримання колагену біомедичного призначення.

**Предмет дослідження** – технологічний регламент реалізації технології кислотного гідролізу з метою отримання колагену біомедичного призначення високої якості.

**Методи дослідження** – методи добору та аналізу наукової інформації.

**Завдання роботи:**

1. Оцінити перспективи застосування препаратів колагену у біомедичній галузі.
2. Вибрати та обґрунтувати технологічний регламент отримання колагену біомедичного призначення.
3. Обґрунтувати вибір технологічного обладнання для реалізації технології отримання колагену біомедичного призначення.
4. Визначити карту контролю при реалізації технології отримання колагену біомедичного призначення.

**Апробація.** Результати кваліфікаційної роботи оприлюднено на III Міжнародній науково-практичній Інтернет-конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології» (Національний фармацевтичний університет, м. Харків, 24 березня 2023 р.). Участь у конференції міжнародного рівня підтверджено сертифікатом учасника (Додаток А) та опублікованими тезами доповіді:

**Харченко Є. В.,** Охмат О. А. Застосування препаратів колагену у галузі біомедицини. *Проблеми та досягнення сучасної біотехнології* : зб. матеріалів доп. учасн. III Міжнар. наук.-практ. Інтернет-конф. (Харків, 24 березня 2023 року). Харків : НФУ, 2023. С. 390–391 (Додаток Б).

**Структура та обсяг кваліфікаційної роботи.** Основна частина кваліфікаційної роботи викладена на 51 сторінці друкованого тексту, містить вступ, три розділи, висновки та список використаної літератури з 46 джерел, 2 додатка.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Колаген – найпоширеніший білок в організмі людини і домінуючий білок у сполучній тканині ссавців. Сьогодні колаген та продукти на його основі широко використовують в харчовій, косметичній, медичній та ветеринарній галузях.

#### 1.1 Загальні відомості про колаген

Колаген становить велику частку всіх білків в організмі ссавців. Даний білок є основою сполучної тканини ссавців і є значущим компонентом сухожиль, рогівки, кровоносних судин, хрящів і слизової оболонки кишківника. Основні функції колагену наведено на рис. 1.1.

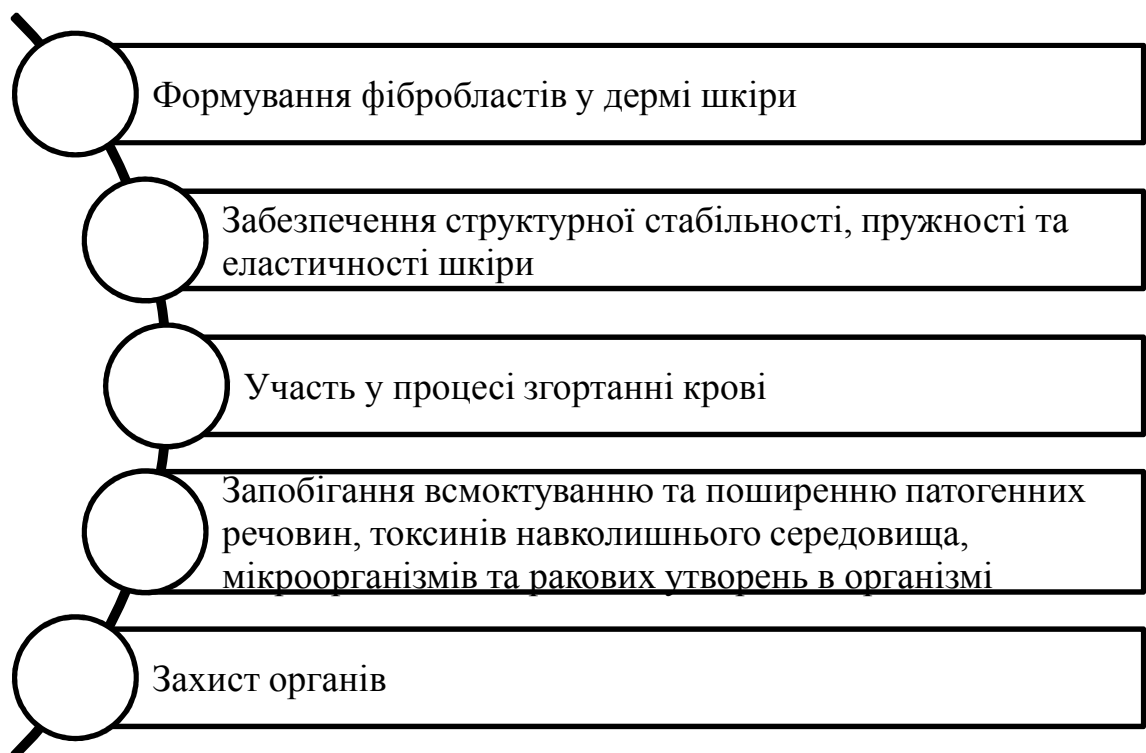


Рисунок 1.1 – Функції колагену

Процес синтезу колагену у ссавців відбувається здебільшого у фібробластах. Водночас фібробласти утворюють капсулу навкруги чужорідних тіл, сприяють загоєнню ран та формуванню рубця на місці рани.

### 1.1.1 Основні характеристики колагену та його елементарний склад

Колаген – фібрилярний білок, що складається з амінокислот. Колаген містить специфічні оксилізін, гліцин, пролін, гідроксипролін та аргінін [1, 2].

Основними є наступні характеристики колагену:

- унікальний амінокислотний склад (наявність оксилізіну; вміст приблизно 33% гліцину, 21% проліну і оксипроліну та 11% аланіну);
- хімічно інертний у своєму природному стані;
- стійкий до зміни розмірів у фізіологічних умовах;
- здатність перетворюватися на желатин або клей при нагріванні у воді.

До елементного складу колагену входять:

- вуглець (близько 50%);
- кисень (близько 25%);
- азот (близько 18%);
- водень (близько 6%).

Слід зазначити, що елементний склад колагену змінюється залежно від виду та віку ссавців.

### 1.1.2 Будова та особливості структури колагену

Колаген має ієрархічну структуру, поділену на різні структурні рівні.

Первинна структура колагену складається з повторюваних послідовностей трьох амінокислот – гліцину, проліну та гідроксипроліну (Gly-Pro-Hyp).

Вторинна структура колагену характеризується наявністю в поліпептидному ланцюзі залишків гідроксильних амінокислот. Молекули колагену зшиваються через поперечні зв'язки, утворені бічними ланцюгами залишків лізіну. У міру старіння в організмі кількість поперечних зв'язків збільшується, і поліпептидні ланцюги колагену згортаються в більш розширені лівозакручені  $\alpha$ -спіралі під час формування вторинної структури.

Третинна структура колагену. Макромолекула складається із трьох лівозакручених спіралей, що скручені у правий бік, довжиною близько 300 нм і

діаметром 1,5 нм. Потрійна спіраль молекули колагену стабілізується водневими зв'язками між спіралями. Крім того, він стабілізується комплексом електростатичних і гідрофобних зв'язків, що підтверджено розшифровкою структури окремих ланцюгів. Складна молекулярна структура потрійної спіралі полягає в тому, що вільний від гліцину бічний ланцюг кожного поліпептидного ланцюга розташований усередині загальної спіралі, а пролінове кільце, гідроксипролінове кільце та бічні групи амінокислот виступають назовні. У сполучній тканині завдяки міжмолекулярним зшиванням молекули колагену об'єднуються у фібрили та волокна.

Четвертинна структура колагену характерна тим, що у тропоколагенах існують міжланцюгові ковалентні зв'язки, а також змінна кількість цих зв'язків між самими спіралями тропоколагену, створюючи добре організовані структури. Більш товсті пучки фібрил утворюються за допомогою білків різних інших класів, включаючи інші типи колагенів, глікопротеїнів, протеогліканів, які використовуються для формування різних типів тканин із різних комбінацій однакових основних білків [3].

Надмолекулярна структура колагену (утворення волокон, що складаються з молекул тропоколагену) є ключовим фактором його функцій в організмі, що відповідає за забезпечення підтримки і з'єднання органів і тканин.

### **1.1.3 Основні типи колагену**

В організмі людини ідентифіковано близько 28 різних типів колагену, але найпоширенішими є 5 типів (рис. 1.2).

Усі типи колагену містять оксилізін – видозмінену амінокислоту, що відіграє важливу роль у структурі колагену. Оксилізін сприяє утворенню трьох спіральної спіралі колагену, яка є основою його міцності. Кількість оксилізіну у колагені залежить від типу колагену. У колагені I типу, який є найбільш поширеним типом колагену в організмі, кількість оксилізіну становить близько 12 % від загальної кількості амінокислот. У колагені II типу – близько 10%. У колагені III типу – близько 8%.

**Колаген I типу**

- Виявляють у складі шкіри, кісток, пульпи зуба, періодонтальних волокон,
- Він бере участь у процесах мінералізації

**Колаген II типу**

- Присутній у хрящах

**Колаген III типу**

- Міститься у м'язах, артеріях та органах

**Колаген IV типу**

- Міститься в дермальному шарі шкіри

**Колаген V типу**

- Присутній у рогівці ока

Рисунок 1.2 – Основні типи колагену [4,5]

Колаген I типу є найпоширенішим білком в організмі людини (шкіра, сухожилля, кістки й інших тканинах).

Колаген II типу – це основний колаген в хрящах.

Колаген III типу виникає в тканині, яка утворена з фібробластів, в організмі цей тип колагену знаходиться в матці, судинах та м'язах [6].

Колаген IV типу в основному міститься в базальній мембрані, формуючи тонкі мембрани між різними тканинами організму.

Колаген V типу виникає на межі рубець утворювальної тканини та тканин на краю рубців. Цей тип колагену завжди є доповненням I типу колагену.

**1.1.4 Основні методи отримання колагену**

Різні типи колагену можна виділити з різних джерел. Промислово отриманий колаген має тваринне джерело походження, наприклад колаген великої рогатої худоби та колаген курки. Також можливим джерелом колагену є морські біологічні об'єкти. Загалом, матеріали суспендують у холодній дистильованій воді протягом 2-3 днів, змінюючи воду двічі на день. Потім

матеріали нарізають на невеликі шматки (приблизно 1 см в довжину) [7].

Одним із методів виділення колагену є екстрагування, а саме обробка нейтральною сіллю, кислотою та/або ферментаційним розчином.

Метод осадження колагену солями був одним із способів, заснованим на обробці колагенвмісної сировини нейтральними сольовими розчинами [8]. Колаген виділяють поступово збільшуючи концентрацію хлориду натрію. Супернатант, що містить солерозчинну фракцію колагену, може бути діалізований.

Однак, відмічено низьку ефективність екстрагування колагену сольовими розчинами. Крім того, здатність до розчинення може бути досягнута шляхом збільшення концентрації солі, що збільшить іонну силу отриманого розчину. Однак у нормальних тканинах частка нейтрального солерозчинного колагену зазвичай незначна, тому кінцевий вихід дуже низький.

Для хімічного кислотного гідролізу використовують різні органічні кислоти, наприклад, оцтову, лимонну або молочну. Також відомо [9] про застосування неорганічної кислоти, такої як хлорводнева кислота. Однак ефективність екстрагування колагену у мінеральній кислоті нижча, ніж у органічних кислот.

Оцтова кислота є найбільш поширеною для здійснення гідролізу з високим виходом цільового продукту [10]. Колаген, екстрагований за допомогою кислотного гідролізу, також відомий як кислото розчинний колаген (ASC). Концентрація, температура екстрагування, час екстрагування та співвідношення сировини та розчину кислоти є важливими параметрами для контролю оптимального виходу колагенових пептидів. Концентрація безпосередньо впливає на значення рН, що змінює електростатичну взаємодію та структурну конформацію колагену. Крім того, рН визначає здатність вилучення певного колагенового пептиду з сировини тваринного походження.

Більшість дослідників проводять кислотний гідроліз за температури менше від 4 °С. Для процесу екстрагування кислоторозчинного колагену зазвичай застосовують 0,5 М оцтову кислоту.

Альтернативний метод, який використовується для забезпечення екстрагування, заснований на солюбілізації при додаванні розведеної оцтової або лимонної кислоти. Кислоти використовують в присутності етилендіамінтетраоцтової кислоти, яка ефективно пригнічує деградацію тканин.

Ферментативний метод гідролізу колагену зазвичай заснований на екстрагуванні колагену органічною кислотою в присутності ферментного препарату, наприклад, пепсину. Супернатанти розчинів екстрагують висолюючи хлоридом натрію, а отриманий осад (вміст чистого колагену) розчиняють в оцтовій кислоті. Потім розчин діалізують проти фосфату натрію.

Хімічний гідроліз традиційно використовується більшістю виробників; проте ферментативний гідроліз є кращим через його переваги перед кислотним гідролізом. Наприклад, ферментативний гідроліз використовується для підвищення різноманітних функціональних і поживних властивостей колагену, отриманого з різних видів сировини [11]. Протеолітичні ферменти (протеази) каталізують протеоліз і допомагають розщепити потрібні спіральні пептиди на окремі пептидні ланцюги. Для гідролізу можна застосовувати різні протеолітичні ферменти, наприклад: пепсин, панкреатин, трипсин, папаїн тощо.

Окрім традиційних перелічених способів отримання колагену використання також знайшли:

- екстрагування колагену за допомогою ультразвуку, який при застосуванні викликає термічні, хімічні та механічні зміни колагенвмісної сировини. Для збільшення ефективності вилучення колагену з сировини тваринного походження використовують обробку сировини органічною кислотою перед впливом ультразвукових хвиль і обробку пепсином після [12].

- «зелена» технологія екстрагування колагену вуглекислим газом при створеному тиску в 50 бар дає змогу підвищити вихід колагену з сировини [13].

- гідростатична обробка за змінними параметрами температури та тиску [14].



## **1.2 Галузі застосування колагену та його препаратів**

В медицині та фармацевтичному виробництві колаген широко використовується вже давно.

Колаген є допоміжною речовиною в технології різних лікарських форм. Колаген розкриває весь фармакологічний спектр властивостей препарату, забезпечує оптимальну дію лікарської речовини, дозволяє знизити концентрацію лікарської речовини при збереженні терапевтичного ефекту, знижує токсичність ряду лікарських речовин, дозволяючи вводити ці препарати у великих кількостях [15].

Значний інтерес викликає використання колагену в медицині, біотехнології, біоінженерії, сільському господарстві, харчовій промисловості та косметичі. Завдяки своїй структурній спорідненості з тканинами і органами людини, здатності легко метаболізуватися і використовуватися організмом, колаген вважається одним з найбільш перспективних біополімерів для використання в реконструктивній і реконструктивній хірургії для усунення дефектів шкіри, рубців, пігментації, а також для загоєння ран різного походження, включаючи важкі опіки, операції на сухожиллях, травми м'язів [16].

### **1.2.1 Використання колагену у медичній галузі**

В першу чергу слід розглянути використання колагену в якості покриву ран: губки для покриття ран і опіків, колагенові плівки для офтальмології [17].

Колагенові покриття створюють оптимальні умови для загоєння ран, завдяки чому запальний процес розвивається в фізіологічно допустимих межах, скорочується час загоєння ран, що підтверджується успішним застосуванням колагену для лікування опіків і ран.

Гістохімічне дослідження дозволяє виділити декілька послідовних фаз загоєння рани при застосуванні колагену:

- травматичне запалення;
- новоутворення сполучної тканини (грануляція), регенерація епітелію;

– формування та перебудова рубця.

З часом ці фази накладаються одна на одну.

У перші дні після нанесення рани розвивається травматичне запалення. Біологічний сенс цього етапу полягає в очищенні і підготовці умов для регенерації. При цьому з другої доби починається друга фаза загоєння - розвиток сполучної тканини, яка закінчується приблизно через 10-15 днів відторгненням струпа. Через 15-20 днів відбуваються процеси інволюції рубця, що утворився на місці колагенового імплантату [17].

Губки, плівки, серветки на основі колагену, просочені антибіотиками, мають добру біологічну сумісність завдяки низькій алергенності колагену. Завдяки біодеградації колагену ранова пов'язка на поверхні рани розчиняється, що запобігає подальшому травмуванню при знятті ранової пов'язки.

На основі колагену отримують біологічно розкладні матеріали під назвою «штучна шкіра». Вони складаються з двох шарів: штучна колагенова мережа з контрольованим розміром клітин покрита протеогліканом. Ця система міцно прикріплена до силіконової мембрани, яка діє як тимчасовий випарник і бактеріальний бар'єр. Після нанесення на вирізану рану колагенова мережа поступово розпадається, заміщується фіброзною тканиною, таким чином утворюється неодерма.

### **1.2.2 Використання колагену в харчовій промисловості**

Незважаючи на те, що колаген не містить повного набору незамінних амінокислот, його вживання в раціоні сприяє оздоровленню шкіри, нігтів і сполучних тканин організму. До того ж, колаген економічно вигідний у використанні, має стійкість до термічних впливів і тривалого зберігання. З поживної точки зору колаген не містить усіх незамінних амінокислот, які потрібні людині, тобто він є неповноцінним білком для харчування [18].

У харчовій промисловості колаген і його гідролізати використовують у виробництві желатину, для освітлення вин, отримання харчових плівкових покриттів та їстівних оболонок, як структуроутворювач, у виробництві штучної

ікри, бульйонів, желе, соусів, різних оздоровчих напоїв і коктейлів, а також як добавку при приготуванні солодоців [18].

### **1.2.3 Використання колагену у ветеринарії**

Основою міжклітинного матриксу є колаген. Від рівня колагену в організмі залежить здоров'я шкіри, шерсті, суглобів, зв'язок, м'язів тварини.

Багато препаратів на основі колагену використовують у ветеринарії для лікування і профілактики захворювань тварин [19]. Використання колагену у ветеринарії особливо актуальне в реабілітаційному післяопераційному періоді та для профілактики зміцнення сполучної тканини, сухожиль і хрящового апарату.

### **1.2.4 Використання колагену в косметичній галузі**

Препарати колагену застосовують для догляду та омолодження шкіри обличчя, шиї та декольте, а також для догляду за шкірою інших делікатних ділянок тіла; при догляді за проблемною жирною шкірою, під час процедур після лазерних і хімічних пілінгів; в салонних програмах – як основа під маски; при безопераційній підтяжці обличчя, після хірургічної пластики; для лікувального та тонізуючого масажу, після депіляції, після пілінгу; для зміцнення нігтів, нігтьового ложа, для розгладження огрубілої шкіри, мозолів, для відновлення та зміцнення волосяного покриву на голові та відновлення кольору волосся [20].

Ефективність колагеновмісної косметики пояснюється тим, що колаген утворює плівку, яка діє як вологий компрес і призводить до зменшення трансепідермальної втрати води шкірою. Завдяки своїм гігроскопічним властивостям колаген підвищує зволоженість ороговілого шару шкіри, що дозволяє розглядати колагенову косметику як геронтопротектор [21].

Колаген входить до складу косметичних засобів для:

– зволоження поверхні шкіри, що володіє пластифікуючими (розгладжує) властивостями, з властивостями вологого компресу;

- подовження (пролонгування) дії екстрактів, олій тощо у складі косметичних композицій;
- надання блиску волоссю, створення колагенового (захисного) шару на поверхні волосини;
- натуральний косметичний колаген гель, заповнюючи зморшки колагену в шкірі людини, відновлює темп роботи фіброblastів (клітин, що виробляють колаген). Відновлюючи цю функцію, колаген не робить шкіру залежною від косметичного засобу [21].

### **Висновки до розділу 1**

1. Колаген та його препарати є перспективними матеріалами для використання у різних галузях промисловості та галузях охорони здоров'я і ветеринарії

2. Широке застосування колагену та його препаратів має ряд переваг:

- ✓ екологічність – колаген є матеріалом біологічного походження,
- ✓ безпека – колаген є безпечним для людини і тварин.
- ✓ ефективність – колаген має широкий спектр застосування і може бути використаний для виробництва різних продуктів і матеріалів.

3. Нові можливості застосування колагену в галузі біомедицині включають покращення загоєння ран, реконструкцію тканин, лікування захворювань кісток та хрящів тощо.

## РОЗДІЛ 2

### ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

Препарати колагену все частіше використовують в біомедицині. Це пов'язано з тим, що колаген має біологічну сумісність з організмом людини. Біомедичні засоби, що містять колаген, можуть використовувати, наприклад, для зменшення запалення шкіри, покращення регенерації тканин, забезпечення підтримки і з'єднання тканин тощо.

#### **2.1 Аналіз ринку біомедичних засобів, що містять колаген**

В наш час перелік біомедичних засобів на ринку досить суттєвий: хірургічні матеріали, кісткові імплантати, мембранні протези, гігієнічні засоби.

Дерматологічні і очні лікарські плівки на основі колагену. Досить часто колаген використовують у виробництві плівок, губок, волокнистих матеріалів.

Плівки отримують висушуванням на повітрі тонкого шару розчинів колагену із заданим значенням рН, з активними фармацевтичними інгредієнтами або без них.

Для отримання плівок використовують 2% оцтовокислий розчин колагену. При цьому отримують розчин колагену в оцтовій кислоті.

Для швидшого розчинення колаген подрібнюють, заливають 3% розчином оцтової кислоти визначеної концентрації і при постійному помішуванні розчиняють до утворення концентрованого розчину, що представляє собою в'язку гелеподібну масу (1 кг колагену розчиняється приблизно в 3 літрах 3% оцтової кислоти). Використання оцтової кислоти зручно тим, що вона є одним із найкращих матеріалів для гідролізу колагену, а її бактерицидні властивості при такій концентрації забезпечують тривале зберігання отриманих білкових розчинів. Для видалення нерозчинних домішок і одночасної гомогенізації розчин колагену продавлюють через фільтри з отворами розміром 0,1-0,2 мм.

Кислоторозчинний колаген стандартизований за наступними показниками:

1. Концентрація колагену повинна бути в межах 0,9 – 1,1%. Вказана концентрація більш зручна для отримання плівок – розчин легко розтікається по поверхні лотка, що дозволяє отримувати плівки однакової товщини по всій поверхні.
2. Кислотність (визначають методом нейтралізації) має бути 0,1-0,15 н.
3. Відносна в'язкість повинна бути не менше 4.

При необхідності до розчину колагену додають дистильовану воду або оцтову кислоту для отримання певної концентрації білка або кислотності розчину.

Для введення лікарських речовин і отримання плівок використовують стандартний 1% розчин колагену. Для збільшення часу розсмоктування рани плівку обробляють сшиваючими реагентами, а для додання еластичності як пластифікатор використовують гліцерин.

Наприклад, розроблено склад і технологію дерматологічної колагенової плівки з метилурацилом. Серед протизапальних засобів був обраний метилурацил, похідний піримідину. Метилурацил, поряд із ослабленням ексудативних і почергових проявів запального процесу, прискорює регенерацію тканин, загоєння ран, опіків тощо. Метилурацил застосовують місцево у вигляді аплікацій, оскільки не має подразнювальної дії.

Враховуючи високу ефективність метилурацилу при лікуванні різних уражень шкіри та слизових оболонок, рекомендується комбінувати метилурацил зі стимуляторами регенерації, що мають інший механізм дії, тобто з біополімером – колагеном. Для реалізації технології розраховану кількість метилурацилу, змішаного з мінімальним об'ємом води, вводять при постійному перемішуванні в 1% розчин колагену. Концентрацію метилурацилу виражають у відсотках від сухого залишку колагену. Плівки успішно застосовуються для лікування пролежнів, трофічних виразок нижніх кінцівок, ран на шкірі з головою.

Необхідність виготовлення очних плівок пролонгованої дії пов'язана з тим, що значною частиною лікарських речовин утруднено проникнення в око через низку причин, таких як наявність гематофтальмологічного бар'єр, складність досягнення необхідної постійної концентрації в очному яблуці при введенні препарату у вигляді ін'єкцій, інсталяцій або перорально.

Внутрішньоочну плівку вводять в очне яблуко і розміщують у місці, передбаченому планом операції, при хірургічному лікуванні ушкоджень переднього відділу ока, планових абдомінальних операціях на очному яблуці, реконструктивно-відновних операціях, хірургічному лікуванні ендоефтальміту.

Наприклад, очні колагенові плівки «Гентрикол», що містять гентаміцину сульфат у поєднанні з тримекаїном, призначені для покриття переднього відділу ока при наявності поверхневих і проникаючих травм рогівки або склери, при опіках. Плівки попереджають можливість вторинного інфікування при транспортуванні хворого з ураженням очей, а також можуть використовуватися при захворюваннях рогівки різної етіології.

Плівки отримують вільним випаровуванням розчинника. Приготований розчин колагену з введеними лікарськими речовинами розливають у кювети з гідрофобною поверхнею (товщина шару 5–7 мм) і дають висохнути. Сушку проводять при температурі 25–30 °С (до утворення плівок товщиною 0,04–0,05 мм із залишковою вологістю 10–15%). Висушені плівки знімають з поверхні кювет, розрізають, упаковують у поліетиленові пакети і стерилізують  $\alpha$ -опроміненням у дозі 25000 Гр [22].

Колагенові губки. Іншою лікарською формою на основі колагену є пористі губки, які отримують шляхом ліофілізації розчинів колагену. Для цього розчин колагену заморожують, потім зневоднюють органічним розчинником і ліофілізують.

Попередньо приготовлений розчин колагену з введеними лікарськими речовинами розливають у спеціальні ємності з нержавіючої сталі або алюмінію (товщина шару 8-10 мм) і залишають рівномірно розподілятися протягом 20-30 хвилин. Кювети переміщують у морозильну камеру і заморожують за

температури від  $-30$  до  $-40^{\circ}\text{C}$ . Потім їх поміщають у попередньо охолоджену установку для сублімаційної сушки за температури  $-40^{\circ}\text{C}$ . Початковий період сушіння характеризується зниженням тиску в апараті до  $13,3322\text{--}66,6610\text{ Н/м}^2$ , за температури  $-30$  –  $-40^{\circ}\text{C}$ . Через 1 годину після включення вакуум-насоса і зниження температури в конденсаторі до  $-70^{\circ}\text{C}$  проводять поступовий нагрів полиць апарату для інтенсифікації процесу сублімації льоду. Впродовж усього періоду сушіння температура не має перевищувати  $-50^{\circ}\text{C}$ . Тривалість процесу складає від 16 до 18 годин. Висушені губки нарізають на частини, упаковують у поліетиленові пакети і стерилізують  $\gamma$ -опроміненням у дозі  $20000\text{--}2000$  Гр. Колагенові губки є чудовим засобом для припинення кровотечі при проникаючих пораненнях і резекції печінки. Ще однією позитивною якістю пористих губок є їх еластичність, що на практиці сприяє рівномірному стисненню кінцівок під час бинтування, посилюючи лікувальний ефект. До складу губок часто вводять рибофлавін, фурацилін, борну кислоту, синтетичні полімери [22].

Порошки колагену. Колаген, отриманий лужно-сольовим методом гідролізу, набуває здатності розчинятися і набухати в кислотах, лугах, буферних розчинниках. У технології лікарських форм часто недоцільно вводити додаткові рН-модифікуючі компоненти (кислоти, луги), які також можуть впливати на біодоступність лікарських речовин та їх сумісність.

В зв'язку з цим дуже перспективним для фармацевтичної практики є отримання порошкоподібного колагену, здатного набухати або розчинятися у воді. Порошок колагену або його суміші з лікарськими речовинами можуть бути самостійною лікарською формою і використовуватися в технології інших лікарських засобів, зокрема таблеток і мазей. При цьому механічне диспергування колагену, що використовується у виробництві порошку, може служити різним цілям:

- 1) подрібнення для зручності транспортування, легкості розчинення, змішування;
- 2) зміна властивостей у заданому напрямку.



Зокрема, коли колаген подрібнюють, його здатність набухати у воді полегшується, що необхідно при виробництві лікарських форм, таких як мазі та супозиторії.

У технології лікарських форм порошкоподібні продукти отримують різними методами, найбільш придатні методи для подрібнення колагену наведені на рис 2.1

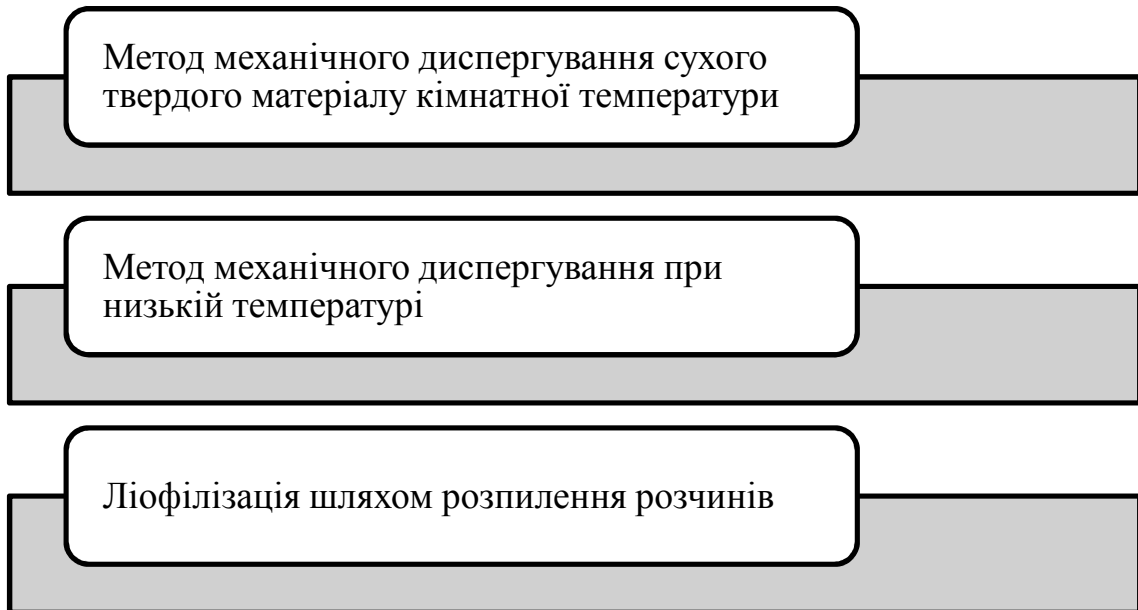


Рисунок 2. 1 – Методи для подрібнення колагену

Мазі на основі колагену. При приготуванні мазевих основ використовують дисперсний колагеновий порошок, отриманий шляхом низькотемпературного подрібнення у концентраціях 2– 5%. При більшій концентрації виходить густа щільна маса, яку доцільно використовувати як основу для свічок.

Технологія отримання основ мазей. Порошок колагену насипають тонким шаром на поверхню дистильованої води ( $\frac{1}{2}$  розрахованого об'єму) і залишають для набухання на 20-30 хв. Залишок води порціями додають до набряклого колагену при постійному перемішуванні електронною мішалкою до утворення однорідного гелю. Масу залишають на добу до повного загущення.

Важливими є реологічні властивості, особливо в'язкість. Від індексу в'язкості і, відповідно, точності її дозування залежить збереження однорідності розподілу лікарських речовин в об'ємі загальної маси мазі, зручність при нанесенні мазі на шкіру і слизові оболонки. В'язкість і міцність мазевих основ істотно впливають на дифузію лікарських речовин в шкіру і слизові оболонки. Всмоктування відбувається швидше з м'яких мазей, які легко наносяться на шкіру, вбираються швидше, ніж високов'язкі та високоміцні пасти.

В'язкість водних колагенових гелів близька до в'язкості гідрофільних мазевих основ із використанням синтетичних полімерів. Низька в'язкість 2-4% колагенових гелів є необхідною умовою для високої швидкості і повного повернення лікарських речовин, що входять до їх складу, що дозволяє наносити мазі на шкіру і слизові оболонки без особливих зусиль і без болю [22].

Колагенвмісні препарати у формі супозиторіїв. Враховуючи позитивну дію вітаміну U при лікуванні деяких гінекологічних захворювань, доцільно створити вагінальні лікарські форми метилметіонінсульфоніл хлориду.

Вибір основи проводять з урахуванням здатності колагену обмежено набухати у водних розчинах вітаміну U (оптимальна концентрація колагену 15%). Для запобігання швидкому висиханню свічок і впливу мікроорганізмів додають гліцерин (6%) і консервант (цетилпіридинію хлорид 0,01%).

Технологія отримання свічок. Вітамін U (0,08 г), консервант і гліцерин розчиняють у розрахунковій кількості води очищеної. Колаген насипають тонким шаром на поверхню водного розчину і дають набухати в ступці 40-50 хвилин при постійному помішуванні. Після цього тісто залишають на 5-6 годин для подальшого набухання, потім добре перемішують до отримання білої еластичної однорідної маси, з якої формують кульки і упаковують їх у поліетиленову плівку [22].

## **2.2 Характеристика цільового продукту**

Біомедичні засоби, що містять колаген, можуть бути ефективними для лікування або полегшення станів, наприклад, при: артрозі (колагенові

імпланти використовують для заміни пошкодженого хряща в суглобах); ранах та/або хворобах шкіри (засоби використовують для загоєння ран).

Біомедичні засоби, що містять колаген, є відносно безпечними. Іншими словами, при застосуванні згаданих препаратів існує низький ризик виникнення побічних ефектів або ускладнень. Побічні ефекти при цьому є легкими і проходять самостійно. Однак можливе і виникнення алергічних реакцій, інфекцій, запалення.

Загалом, для екстрагування колагену з колагенвмісної сировини застосовують 3 основних методи гідролізу: кислотний, ферментативний, лужно-сольовий.

Кислотний гідроліз дає можливість отримати триспиральну молекулу з неущкодженими тілопептидами, що утворює пружні гелі.

Ферментативний гідроліз, що зазвичай здійснюють за допомогою пепсину та трипсину, дає можливість отримати структуру з частково ушкодженими тілопептидами, що утворює не пружні гелі.

Лужно-сольовий гідроліз характеризується високим виходом розчинного колагену зі збереженою потрійною спіраллю, але з дезамінуванням аспарагінових і глутамінових залишків відповідних амінокислот. Наслідком останнього є порушення розподілу зарядів уздовж триспиральної молекули колагену, і, відповідно, до втрати здатності до утворення колагеном фібрил. Такий колаген гелів не утворює.

Для біомедичного застосування використовують переважно колаген, отриманий методом кислотного гідролізу. І якщо для косметичної та харчової галузей переважно застосовують колаген з сировини морського походження, то для біомедичного застосування використовують колаген, отриманий з сировини тваринного походження.

Дослідження також показали перспективність застосування порошоків колагену, особливо при роботі з ранами пацієнтів, отриманих після біопсії шкіри, як і первинне закриття швами, що не розсмоктуються, згідно з першим у

своєму роді дослідженні, опублікованому в Журналі ліків в дерматології групою лікарів-дослідників з Університету Джорджа Вашингтона [23].

Команда досліджувала ефективність місцевого застосування порошку колагену порівняно з первинним закриттям на швидкість та якість загоєння ран на всю товщину за допомогою гістопатологічного аналізу загоєння та порівняння симптомів та ранніх результатів.

Колаген найбільш відомий як важливий структурний компонент декількох органів, особливо шкіри, але він також відіграє ключову роль сигнальної молекули в регуляції всіх фаз загоєння ран. Таким чином, при зовнішньому застосуванні колагеновий порошок має значний потенціал для загоєння ран та догляду за ними завдяки своїй здатності зупинити кровотечу, рекрутувати імунні клітини та клітини шкіри, необхідні для загоєння ран, а також стимулювати утворення нових кровоносних судин, і його можна залишати в ранах без викликання запалення або сприяючи виникненню інфекцій.

«Під час нормального загоєння ран колаген діє як каркас для проникнення та зростання клітин у місці рани», – сказав Адам Фрідман, доктор медичних наук, тимчасовий завідувач кафедри дерматології Школи медицини та охорони здоров'я – автор дослідження. Команда Фрідмана провела дві пункційні біопсії восьми добровольцям та обробила одну рану щоденним місцевим порошком колагену, а іншу – стандартним препаратом. Через чотири тижні з ран брали біопсію для аналізу, і випробуваних просили оцінити свербіж, біль та переваги у лікуванні протягом усього процесу.

Дослідники виявили, що шість з восьми ран, оброблених колагеном, повністю загоїлися через чотири тижні після початкового поранення, а всі рани повністю загоїлися через вісім тижнів після другої біопсії. Команда дійшла висновку, що на підставі цих результатів рани, оброблені колагеновим порошком, зажили принаймні так само добре, як і рани, оброблені звичним способом, і що порошок можна безпечно застосовувати впродовж як мінімум чотирьох тижнів.

«Враховуючи вартість та час накладання та зняття швів, а також потенційну компенсацію витрат на колаген, використання місцевого порошку колагену для ран, отриманих при пункційній біопсії, може бути простіше для пацієнта, не вимагаючи додаткового відвідування медичної установи для зняття швів та забезпечуючи еквівалентне або, можливо, найкраще загоєння ран» – сказав Фрідман.

### **2.3 Вибір сировини для отримання колагену біомедичного призначення**

Основним джерелом сировини для виробництва колагену є тканини тварин, зокрема корів, свиней та курей. Найчастіше для отримання колагену використовують шкіру, кістки та хрящі цих тварин. Використання морського колагену в біомедицині обмежене але допускається.

*Колаген тваринного походження.* Отриманий промисловим шляхом колаген має тваринне джерело походження. Сировиною можуть бути шкури птахів, великої рогатої худоби, свиней. Виробництво колагену тваринного походження повинно чітко відповідати параметрам здійснення технологічного процесу і проходити контроль якості [24].

Шкіру і кістки свиней часто використовують для отримання промислового колагену. Оскільки вказаний колаген дуже схожий на людський, ризик алергічної реакції менший порівняно з колагеном, отриманим з іншого виду сировини тваринного походження. Проте такий колаген також становить зоонозну небезпеку, а в деяких країнах він заборонений через неможливість використання свиней з релігійних причин [25].

Оскільки сполучна тканина є найважливішим компонентом м'яса, одним із найпоширеніших джерел колагену також є сировина, отримана при переробці м'яса. Використання цієї сировини без попередньої обробки пов'язане з певними труднощами, зокрема з низькою біологічною активністю. До ефективних методів отримання колагену з м'ясної сировини відноситься ферментативний гідроліз. Його особливістю, на відміну від хімічних методів, є

те, що процес ведеться за температури від 35 до 50 °С [26].

Отримання колагену зі стерильних курячих хрящів за допомогою ультразвукової обробки забезпечує вивільнення білка колагену типу II з підвищеним вмістом амінокислот. Такий колаген характеризується термостабільністю і має більш пористу структуру, кращі фізико-хімічні та функціональні властивості. Однак отримання колагену з курячого хряща обмежене, оскільки вихід білка низький при значних витратах на процес екстрагування колагену.

Колаген тваринного походження широко поширений у сучасній промисловості. Для більш ефективного вилучення чистого колагену з тваринної сировини використовують методи оброблення ультразвуком і застосування ферментних препаратів мікробного походження [27].

*Колаген морського походження.* Альтернативним отриманням колагену є морські біологічні об'єкти, на даний час найбезпечніше джерело колагену. Метод передбачає використання морських безхребетних і хребетних, зокрема риб, медуз, губки, морські їжаки, восьминоги, кальмари, каракатиці, актинії і креветки. Такий колаген має ряд переваг: низька запальна реакція, менша імуногенність, метаболічна сумісність, відсутність ризику зоонозів, переважно відсутні релігійні та етичні аспекти його використання.

Наприклад, розроблено технологію отримання колагенової губки з риби *Arothron stellatus*, просоченої антибактеріальним препаратом ципрофлоксацином. Технологія отримання колагенової губки полягає в поетапному висушуванні. Ця губка дуже добре набухає, вбираючи ексудати, які покращують її механічні властивості *in vivo*. Губчаста колагенова структура, просочена ципрофлоксацином, має антибактеріальні властивості. Крім того розроблений колагеновий препарат має ранозагоювальні властивості, індукує ранній синтез колагену та експресію фактора росту впродовж першої доби рубцювання [28].

Шляхом вилучення колагену з прісноводних або морських риб переважно застосовують кістки, шкіру, плавники, луску. Це у свою чергу сприяє

зменшенню забруднення навколишнього середовища, оскільки побічні продукти вважають відходами рибопереробки. Основними недоліками цього колагену є низька температура денатурації та обмежена доступність до джерел сировини, контроль якості готової продукції.

Отриманий колаген з морських біологічних об'єктів можна використовувати як у медицині і біофармацевтичній промисловості, так і в косметології.

До інших (специфічних) джерел отримання належить колаген з хвостів кенгуру, сухожилля щурячого хвоста, качиних лап, сухожилля і перикарду коней, кісток і шкір алігаторів, лап птахів, шкір овець і кіз, шкір жаб [29].

Відповідно до Регламенту європейського Союзу № 853/2004 від 29.04.2004 р., «колаген» є продуктом, що отримують з кісток, шкір, шкір і сухожилля тварин, вироблений за відповідними вимогами за суворого дотримання всіх санітарних та законодавчих норм.

Відповідно до вищезазначеного, у кваліфікаційній роботі пропонується отримання колагену зі шкір великої рогатої худоби.

#### **2.4 Вибір та обґрунтування технології отримання колагену методом кислотного гідролізу**

Кислотний гідроліз може бути здійснений за допомогою органічних кислот, таких як оцтова, лимонна, молочна кислота, а також мінеральних кислот – хлоридна кислота. Однак вважають, що органічні кислоти є більш ефективними, ніж мінеральні кислоти [30, 31]. Органічні кислоти здатні розчиняти незшиті колагени, а також руйнувати деякі міжланцюгові поперечні зв'язки у колагені, що призводить до більш високої розчинності колагену під час процесу екстрагування.

Перед здійсненням кислотного гідролізу обов'язково проводять цикл підготовчих процесів. Мета – підготовка сировини тваринного походження до екстрагування з неї колагену. Цикл підготовчих процесів може включати

процеси та операції: промивання, відмочування, знежирювання, зневолошування-зоління, промивання.

Для знежирювання використання традиційних для цього поверхнево-активних речовин обмежене призначенням цільового продукту. Тому на практиці можуть застосовувати спиртові або ефірні розчини.

Стадію зневолошування-зоління зазвичай здійснюють за допомогою лужних реагентів гідроксиду кальцію та гідроксиду натрію. Тривалість обробки лугами залежить від товщини колагенвмісного матеріалу, щільності його колагенової структури. При обробці лугами структура дерми шкіри набухає, забезпечуючи тим самим доступ матеріалів до тканинного матриксу. Луги також гідролізують баластні неколагенові білки, ліпіди, пігменти та інші органічні речовини [32].

Ефективною для зневолошування є і обробка сировини ферментами: пепсином або протеазами.

Перспективним є застосування протеаз, отриманих з культуральної рідини після ультрафільтрації при культивуванні *Bacillus subtilis*.

Загалом, процеси хімічного гідролізу спрямовані на пошук оптимальних параметрів для отримання більш високого виходу шляхом варіювання концентрації реагентів, рівня рН, температури та тривалості гідролізу.

Визнають, що найкращою кислотою для здійснення кислотного гідролізу є оцтова кислота. Вплив концентрації кислоти на гідроліз колагену досліджують зазвичай за температури 40 °С в інтервалі 0,25 М – 1,5 М розчину оцтової кислоти. Найбільшого виходу білка (30–34 %) можна досягти про концентрації оцтової кислоти рівної 1,5 М.

Дослідження з варіюванням параметрів екстрагування колагену з внутрішнього шару шкіри великої рогатої худоби представлені у табл. 2.1. [33 – 37].



Таблиця 2.1 – Підбір оптимальних параметрів здійснення кислотного гідролізу для отримання колагену біомедичного призначення

| Змінні параметри здійснення гідролізу            | Температура та тривалість гідролізу  | Результати дослідження   |
|--|--|--|
| Рівень рН:<br>3, 5, 7, 10                        | Температура, °С:<br>50, 60, 80.<br>Тривалість – 6 год.<br>Постійне перемішування | Найвищий вихід колагену отримано при обробці за температури 80°С і рН нижче ізоелектричної точки. Продукти, отримані в умовах екстремальних значень рН (3 і 10) або високих температур (60 і 80°С) були повністю денатуровані, мали невелику молекулярну масу; утворювали високо пружні гелі.    |
| Концентрація оцтової кислоти, М: 0,3; 0,5; 0,8 М | Температура, °С:<br>10, 20, 30.<br>Тривалість в інтервалі, год.:<br>12– 36.      | Дослідження показало, що підвищення температури та концентрація оцтової кислоти збільшували вихід колагену до певного значення, яке потім знижувалось. Оптимальні умовами для отримання найбільшого виходу колагену: концентрація оцтової кислоти 0,5 М за температури 24–25°С впродовж 32 годин |
| Концентрація оцтової кислоти<br>0,5 М            | Температура –<br>4°С.<br>Тривалість – 48 год.                                    | Вихід колагену з колагенвмісної сировини морського походження складає 28,5 %, з сировини тваринного походження – 15,8 %. В обох випадках колаген був ідентифікований як колаген І типу.  |

Підсумовуючи вищесказане, загальна схема реалізації технології кислотного гідролізу колагенвмісної сировини передбачає:

- відбір сировини тваринного походження;
- цикл підготовчих процесів та операцій;
- подрібнення сировини тваринного походження;
- екстрагування не колагенових білків;
- екстрагування колагену шляхом обробки оцтовою кислотою;
- осадження та очищення колагену;
- отримання цільового продукту.

## 2.5 Технологічна схема отримання колагену

Технологічна схема включає три основні складові: допоміжні роботи, технологічний процес, етап знешкодження відходів виробництва.

### *Допоміжні роботи.*

Допоміжні роботи передбачають обов'язкове здійснення:

- санітарної підготовки виробництва;
- підготовки технічного персоналу, його інструктаж, навчання, забезпечення робочим одягом, медогляд;
- підготовку виробничих приміщень, що передбачає приготування мийних та дезінфікуючих засобів, прибирання;
- підготовку виробничого обладнання, що передбачає приготування мийних та дезінфікуючих засобів, миття обладнання, технічний огляд, стерилізацію;
- підготовку сировини та матеріалів для здійснення технології гідролізу.

### ***Технологічний процес.***

Реалізація технології кислотного гідролізу, включаючи стадії сублімаційного сушіння та пакування цільового продукту.

### ***Переробка або знешкодження відходів виробництва.***

Знешкодження рідких, твердих та газоподібних відходів виробництва.

Розглянемо особливості здійснення підготовчих процесів та операцій для реалізації технології кислотного гідролізу.

### ***Підготовка сировини тваринного походження.***

Шкури великої рогатої худоби відбирають на бойнях, проводять мікробіологічний контроль, укладають на зберігання. Шкури зберігають у замороженому вигляді в морозильних камерах.

Перед екстрагуванням шкури розморожують та ретельно промивають від бруду до нейтрального значення рН = 6,5.

Для спрощення обробки сировину розрізають на шматки площею 10–20 см<sup>2</sup>. Подальша технологія передбачає зневолошування сировини.

Особливістю застосовуваної у роботі технології є заміна традиційного процесу зневолошування шкур великої рогатої худоби сильно лужними матеріалами (сульфід натрію, гідросульфід натрію, гідроксид кальцію).

Використання ферментів – один з найбільш перспективних методів екологічно ощадних технологій виробництва шкіри та переробки шкур тварин. Використання ферментів на стадії зневолошування-зоління дає змогу:

1. Скоротити тривалість технологічного циклу,
2. Зменшити витрати хімічних матеріалів, отримати структуру високої якості,
3. Видалити волосяний покрив без пошкодження власне шерсті.

Отже, для мінімізування екологічного навантаження на довкілля, скорочення тривалості процесу зневолошування, а також з метою спрощення промивки сировини перед стадією гідролізу запропоновано використання ферментативної обробки. У цьому дослідженні було використано фермент, отриманий при культивуванні штаму *Bacillus subtilis* BLBc 11 [38].

Рід *Bacillus* є основним для комерційного виробництва лужних протеаз. Вказані продуценти лужної протеази розповсюджені у стічній воді м'ясокомбінатів і шкіряних підприємств. Застосовуваний нами штам *Bacillus subtilis* BLBc 11 було виділено з аеробного осаду шкіряного заводу.

Застосовувані у технології ферменти отримують з культуральної рідини після центрифугування на швидкості 10 000 об/хв. впродовж 15 хв. Отриманий після центрифугування супернатант проходить кілька ступенів очищення, включаючи ультрафільтрацію та гель-фільтрацію.

Застосування ферменту, отриманого мікробним синтезом зі штаму *Bacillus subtilis* BLBc 11, дозволяє провести зневолошування-зоління сировини за 6-8 годин при температурі 37–39 °С. Дослідження використання даного ферменту для зневолошування проводили шляхом застосування ферменту в концентраціях від 200 ОД г<sup>-1</sup> до 300 ОД г<sup>-1</sup> шкіри. Контроль – повне і легке відділення волосу зі шкіри.

Вказана ферментна обробка сприяє:

1. Отриманню непошкодженої колагенової структури;
2. Видаленню міжфібрилярних білків;
3. Отриманню більш доступної структури дерми, що забезпечує швидку та рівномірну дифузію хімічних матеріалів в подальших процесах;
4. Зменшенню рівня показників хімічного споживання кисню та біологічного споживання кисню у відпрацьованих стічних водах;

5. Зменшенню концентрації азоту та сульфідів у відпрацьованих стічних водах;

6. Руйнуванню виключно зв'язку волосу шкіри тварини з її дермою, без пошкодження дисульфідного зв'язку кератину.

Після ферментативного зневолошування шматки сировини ретельно промивають холодною водою при постійному перемішуванні в реакторі, оснащеному шерстеуловлювальними фільтрами. Обов'язковому контролю підлягає повне зневолошування дерми. За необхідності, залишки волосяного покриву механічно видаляють з поверхні шматків сировини. Якщо механічне знімання волосу проводять, сировину знову ретельно промивають водою при постійному перемішуванні за температури меншій від 10 °С.

Механічне подрібнювання промитої сировини ведуть до отримання шматочків розміром 0,3 – 0,5 см, після чого шматочки гомогенізують.

Очищення гомогенізованої колагенвмісної сировини від баластових речовин здійснюють у п'ятикратному об'ємі розчину 0,5 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Тривалість обробки сировини динатрію фосфатом складає 24 години за температури 4 °С. Після чого сировину віджимають центрифугуванням.

Колагенвмісну сировину ретельно промивають кілька разів водою до встановлення рівня рН 6,5.

Розглянемо послідовність здійснення стадії технологічного для отримання цільового продукту.

#### *Екстрагування.*

Екстрагування колагену проводять у п'ятикратному 0,5 М розчині оцтової кислоти. Тривалість екстрагування оцтовою кислотою складає 24–36 годин за температури 4 °С. При здійсненні екстрагування обов'язковому постійному контролю підлягає рівень рН, температура та вміст загального азоту у реакційній масі.

#### *Осадження та очищення екстрагованого колагену.*

Ультрафільтрацію здійснюють за допомогою прокачування екстракційної маси під тиском до 9 бар через систему мембранних фільтрів.

Осадження колагену з фільтрату проводять 0,9 М розчином хлориду натрію впродовж 20-24 годин за температури 4°C.

Після осадження проводять центрифугування за температури 4°C на швидкості 5000 об./хв. впродовж 30 хв.

Після осадження проводять:

– Повторне розчинення колагену у п'ятикратному 0,5 М розчині оцтової кислоти проводять за температури 4 °C впродовж 24 год.;

– Повторне осадження колагену з фільтрату 0,9 М розчином хлориду натрію впродовж 20-24 годин за температури 4°C;

– Центрифугування за температури 4°C на швидкості 5000 об./хв. впродовж 30 хв.

Цільовий продукт отримуємо шляхом леофілізації, яка має ряд переваг над іншими методами висушування колагену:

- Збереження структуру колагену;
- Збереження біологічних властивостей колагену;
- Подовжений термін зберігання цільового продукту;
- Зручність транспортування цільового продукту.

Вихід колагену за технологією складає 2,4 % по відношенню до вихідної колагеновмісної сировини.

Стадія утилізації або знешкодження відходів передбачає збір рідких (вода, використана для технологічних, санітарних та побутових потреб, конденсаційна волога), твердих (упаковки від хімічних матеріалів, мийних та дезинфікувальних засобів), газоподібних відходів. За можливості відходи виробництва підлягають очищенню та переробці. За неможливості очищення , відходи транспортують на знешкодження.

Загальну схему отримання цільового продукту представлено на рис. 2.2.

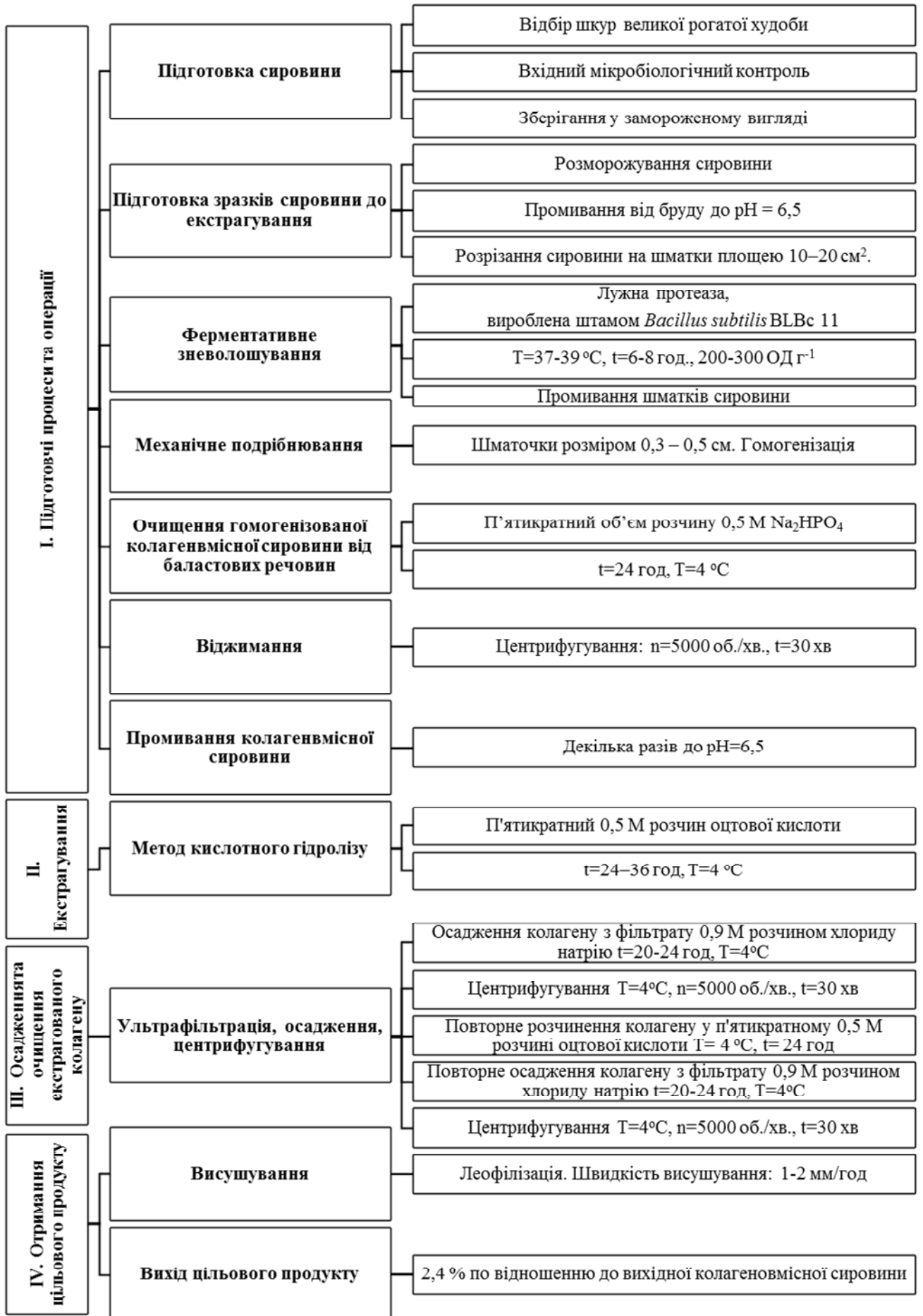


Рисунок 2.2 – Схема отримання колагену

## 2.6 Вибір обладнання для реалізації технології

Для реалізації технології отримання колагену біомедичного призначення пропонується використання високотехнологічного обладнання з можливістю автоматичного керування процесами, оснащеного автоматичними системами контролю параметрів здійснення процесів, забезпеченого системами для перекачування та подачі реакційних сумішей тощо.

Для проведення підготовчих процесів пропонуємо застосування хімічного реактора із електричним нагріванням від виробника STS Group (Україна) [39]. Цей пристрій використовується для змішування, нагрівання або охолодження компонентів із протіканням хімічної реакції (рис. 2.3).



Рисунок 2. 3 – Загальний вигляд хімічного реактору із електричним нагріванням STS Group

Хімічний реактор оснащено перемішувальним пристроєм. Для зручності вивантаження сировини конструкцією передбачена можливість перекидання робочого резервуару. Комп'ютерна система реактора дозволяє автоматично керувати технологічними параметрами (температура, тривалість, швидкість обертання перемішуючого пристрою, тривалість процесу) та контролювати ряд параметрів (рівень рН та температури).

|   |  |
|---|--|
| Об'єм резервуара  | • 0.05 куб. м  |
| Тип резервуара за способом встановлення                 | • Вертикальний з можливістю перекидання резервуару для вивантаження сировини |
| Тип резервуара за кількістю секцій                      | • Односекційний  |
| Матеріал, з якого виготовлено резервуар                 | • Нержавіюча сталь   |
| Антибактеріальне покриття резервуара                    | • Так  |
| Системи подачі матеріалів, контролю параметрів процесів | • Так  |

Рисунок 2. 4 – Загальні характеристики хімічного реактору із електричним нагріванням STS Group

Для подрібнення та гомогенізації сировини тваринного походження запропоновано використання подрібнювача (кутер) ZUVER Mega Grinder 9, Німеччина (рис. 2.5) [40].



Рисунок 2.5 – Загальний вигляд подрібнювача ZUVER Mega Grinder 9



Модель подрібнювача оснащена плавним регулюванням швидкості. Корпус та чаша виконані з нержавіючої сталі, кришка – з прозорого пластику. Мікрровимикач кришки забезпечує зупинку роботи при знятому важелі, блокування запуску до встановлення кришки. Сталевий рухомий важіль для блокування кришки. Основні характеристики подрібнювача ZUVER Mega Grinder 9 наведено на рис. 2.6.

|                      |             |
|----------------------|-------------|
| Кількість швидкостей | • Варіатор  |
| Об'єм чаші           | • 9 л       |
| Тип установки        | • Настільна |
| Потужність           | • 1,8 кВт   |
| Вага                 | • 18,9 кг   |
| Довжина              | • 470 мм    |
| Ширина               | • 270 мм    |
| Висота               | • 390 мм    |

Рисунок 2.7 – Загальні характеристики подрібнювача ZUVER Mega Grinder 9

Для проведення екстрагування запропоноване застосування хімічного реактору STS Group (рис. 2.7, 2.8) [41]. Пропоноване обладнання дозволяє здійснювати технологічний процес за стандартами GMP.



Рисунок 2.7 – Загальний вигляд хімічного реактору STS Group

|  |  |
|--|--|
| Об'єм резервуара                           | • 0.05 куб. м  |
| Тип резервуара                             | • Вертикальний, односекційний, з оглядовим вікном                                  |
| Оснащення                                  | • Термоізоляція, гомогенізатор, мішалка, система для перекачування реакційної маси |
| Матеріал резервуара                        | • Нержавіюча сталь з антибактеріальним покриттям                                   |
| Механізми                                  | • Підйому кришки, перекидання резервуару   |
| Автоматизована система керування процесами | • Так  |
| Датчики для постійного контролю за         | • Тиском, температурою,  |

Рисунок 2.8 – Загальні характеристики хімічного реактору STS Group

Для центрифугування запропоноване застосування обладнання сумської машинобудівельної компанії АТ «СМНВО-Інжиніринг» [42]. Центрифуга трубчаста ОТР-102К-01 [43] з освітлювальним ротором сконструйована для освітлення суспензій з високодисперсною твердою фазою, кількість якої не перевищує 1% (білкові суспензії, культуральні рідини, білок крові) (рис.2.9, 2.10).



Рисунок 2.9 – Загальний вигляд трубчастої центрифуги ОТР-102К-01

|   |               |
|---|---------------|
| Діаметр ротора внутрішній, макс                               | • 105 мм      |
| Робоча висота ротора  | • 740 мм      |
| Фактор розділення (при максимальній частоті обертання ротора) | • 16940 об/хв |
| Частота обертання ротора, макс                                | • 17000 об/хв |
| Максимальне завантаження                                      | • 8,5 кг      |
| Електродвигун: потужність                                     | • 3 кВт       |

Рисунок 2.10 – Загальні характеристики трубчастої центрифуги ОТР-102К-01

Для висушування запропоновано застосування сублімаційної сушарки фармацевтичної (модель СС-100) [44].

Цей пристрій призначений для сушіння продуктів методом сублімаційного зневоднення у вакуумі. У цьому методі поєднуються два відомих методи – заморожування і сушіння у вакуумі (рис.2.11, 2.12.).



Рисунок 2.11 – Загальний вигляд сублімаційної сушарки фармацевтичної  
(модель СС-100)

Ліофільна сушарка моделі СС-100 дозволяє завантажувати до 100 кг продуктів на цикл завдяки розширеній площі полиць і конструкції. Управління та контроль параметрів сублімаційної сушарки та логування показань датчиків можна побачити у спеціальному додатку для моніторингу роботи сушарки, який доступний для Android, iOS і Desktop на базі операційної системи Windows.

|  |                   |
|--|-------------------|
| Продуктивність                               | • 100 кг/цикл     |
| Об'єм льоду                                  | • 100-150 кг/цикл |
| Температура конденсатора                     | • -40 °С          |
| Температура полиць                           | • 60 °С           |
| Температура охолодження продукту у морозилці | • -30 °С          |
| Корисна площа полиці                         | • 10 м. кв.       |
| Кількість полиць                             | • 10              |
| Розмір полиці                                | • 500*2000        |
| Нагрів полиць                                | • Електричний     |
| Кількість лотків для продукту                | • 20              |
| Холодоагент                                  | • R507            |
| Максимальний рівень вакууму                  | • 30 Па           |
| Встановлена потужність                       | • 19 кВт          |
| Спосіб розморожування                        | • Зворотною парою |

Рисунок 2.12 – Загальні характеристики сублимаційної сушарки фармацевтичної (модель СС-100)

## Висновки до розділу 2

Аналіз ринку біомедичних засобів, що містять колаген, свідчить про значний потенціал для розвитку цього сегмента.

За основу в роботі обрано технологію екстрагування колагену з сировини тваринного походження.

Запропоновано використання ферменту мікробного походження на стадії

зневолошування-зоління сировини. Заміна традиційної сильно лужної обробки шкіри на вказаній стадії на обробку лужною протеазою дозволяє зменшити навантаження на навколишнє середовище, отримати структуру дерми з непошкодженими колагеновими волокнами.

Технологія отримання цільового продукту передбачає проведення циклу допоміжних робіт, здійснення технологічного процесу, реалізацію стадії утилізації та/або знешкодження відходів.

Наведений загальний опис, характеристики та переваги обладнання, запропонованого для реалізації технології отримання колагену біомедичного призначення.

## **РОЗДІЛ 3**

### **КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ**

Контроль на виробництві здійснюють на всіх без виключення етапах виробництва колагену біомедичного призначення. Постійному контролю підлягають: персонал, виробничі приміщення та мікроклімат у них, справність та стерильність використовуваного обладнання; вхідна сировина та цільовий продукт; дотримання технологічних параметрів здійснення технологічного циклу з виробництва цільового продукту.

#### **3.1 Контроль чистоти приміщень виробництва**

Чистота приміщень контролюється виконанням низки заходів.

Заходи контролю включають:

1. Використання антисептиків та миючих засобів для підтримки чистоти приміщень та обладнання.
2. Фільтрацію повітря: використання спеціальних фільтрів для очищення повітря та збору газоподібних викидів.
3. Підтримку робочих місць у належному стані: регулярне очищення та стерилізація робочих місць, устаткування та поверхонь, з якими контактує персонал, щоб запобігти забрудненню середовища.
4. Контроль над доступом: здійснення строгого контролю над доступом працівників до приміщень, наявність спецодягу у працівників.
5. Моніторинг параметрів, які впливають на чистоту приміщень (температура, вологість, тиск, концентрація шкідливих речовин тощо).
6. Інструкції та навчання: надання працівникам інструкцій та навчання працівників з питань дотримання процедур стерилізації та збереження чистоти приміщень.
7. Регулярна перевірка та аудити: проведення регулярних перевірок та аудитів для впевненості в тому, що процедури та стандарти чистоти дотримуються належним чином.

8. Впровадження відео систем спостереження: використання систем спостереження та моніторингу для контролю за рухом матеріалів і людей на виробництві [45].

### **3.2 Контроль персоналу**

Контроль персоналу на виробництві важливий для забезпечення безпечної та ефективної виробничої діяльності. Основні аспекти контролю персоналу в таких умовах включають:

Обов'язкове проходження медичного огляду та вакцинації, що відповідають стандартам чистих приміщень.

Проведення навчання та тренінгів з питань безпеки, особистої гігієни та відповідності процедурам чистоти.

Вимога до носіння спеціального захисного одягу, включаючи костюми, рукавиці, маски та головні убори.

Використання систем контролю доступу, таких як картки з доступом та відбитки пальців, для обмеження доступу та контролю присутності персоналу в чистих приміщеннях.

Постійний моніторинг за дотриманням правил чистоти та безпеки на робочих місцях та місцях загального користування.

Регулярна перевірка стану здоров'я персоналу та їхньої відповідності вимогам чистих приміщень [46].

### **3.3 Вхідний контроль сировини тваринного походження**

Контроль сировини тваринного походження – це процес перевірки та забезпечення якості та безпечності сировини, яка використовується для виробництва колагенових продуктів. Цей контроль включає в себе аналіз, ідентифікацію та тестування сировини з метою переконання, що вона відповідає стандартам якості, не містить шкідливих речовин, і є безпечною для використання в медицині, косметичі, харчовій промисловості тощо.

Перший крок – вибір сировини, яка включає шкури, або хрящі, або кістки



тваринного походження. Важливо обирати сировину відомого постачальника та впевнитися у її якості.

Відібрану сировину класифікують за видом тварин, віком, частиною тіла тощо. Цей етап є важливим для корегування параметрів використовуваної технології.

Проводять хімічний аналіз, щоб визначити вміст колагену та інших складових сировини.

Визначають вміст важких металів, проводять фізичні, хімічні та мікробіологічні тести для визначення якості сировини та її відповідності стандартам.

Після успішного контролю сировину маркують та зберігають з дотриманням відповідних умов у морозильних камерах.

Такий контроль допомагає гарантувати, що колагенові продукти виготовлені з сировини тваринного походження, безпечні для споживачів.

### **3.4 Визначення амінокислотного складу колагену**

Визначення амінокислотного складу колагену – це процес аналізу складових амінокислот, які входять у структуру колагену.

Для дослідження колаген піддається гідролізу, що полягає в розщепленні білка на окремі амінокислоти, наприклад, за допомогою ферментів трипсину або холінестерази. Отриманий гідролізат піддається обробці для видалення зайвих речовин, таких як солі та інші домішки. Підготовану пробу аналізують за допомогою методів хроматографії, таких як рідинна або газова, що дозволяє розділити амінокислоти та ідентифікувати їх кількісний склад.

Для визначення амінокислот використовують УФ-детектор або мас-спектрометричний детектор, які дають змогу визначити кількість кожної амінокислоти у пробі.

Окрім хроматографічних методів можуть бути застосовані методи мас-спектрометрії або інфрачервоної спектроскопії.

### 3.5 Мікробіологічний контроль цільового продукту

Мікробіологічний контроль колагену – незамінний та важливий етап у виробництві будь-яких матеріалів біомедичного призначення. Тобто мікробіологічний контроль є важливим елементом безпеки колагенових продуктів, який дозволяє гарантувати, що продукти є безпечними для використання.

Лабораторні дослідження проводять на визначення повної відсутності у зразках цільового продукту:

- патогенних бактерій: *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*
- грибів: *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Fusarium spp.*, *Candida spp.*, *Rhodotorula spp.*
- вірусів.

### Висновки до розділу 3

Для отримання безпечних продуктів колагену з сировини тваринного походження необхідно дотримуватися низки заходів:

- використовувати тільки високоякісну сировину та проводити її вхідний мікробіологічний контроль,
- дотримуватись належних санітарних умов на всіх етапах виробництва,
- здійснювати постійний моніторинг технологічних параметрів при реалізації всього циклу технології отримання цільового продукту,
- постійно проводити мікробіологічний контроль цільового продукту.

## ВИСНОВКИ

1. В роботі представлено загальні відомості про колаген та галузі його застосування. Досліджено ринок біомедичних засобів, що містять колаген, та оцінено перспективи його розвитку.

2. Сировиною для екстрагування колагену обрано шкури великої рогатої худоби. Запропоновано використання технології кислотного гідролізу за умови використання оцтової кислоти. З метою покращення екологічного аспекту проведення стадії зневолошування сировини тваринного походження запропонована заміна лужної обробки на ферментативну, екологічно ощадну. Для зневолошування сировини перед кислотним гідролізом використано лужну протеазу – фермент, отриманий при культивуванні штаму *Bacillus subtilis* BLVc 1, виділеного з аеробного осаду шкіряного заводу.

3. Для реалізації технології виробництва колагену біомедичного призначення запропоновано використання реакторів виробництва STS Group, подрібнювача/гомогенізатора марки ZUVER Mega Grinder 9, трубчастих центрифуг з освітлюючим ротором марки ОТР-102К-01 та сублімаційної сушарки СС-100 Cryovit.

4. Обґрунтовано систему контролю на виробництві. В роботі передбачено вхідний мікробіологічний контроль сировини тваринного походження та цільового продукту. Окреслено методи визначення амінокислотного складу колагену.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Чи всім потрібен додатковий колаген і де його брати? URL: <https://med-expert.com.ua/journals/ua/news/chi-vsime-potribnij-dodatkovij-kolagen-de-jogo-brati/> (Date of access: 26.10.2023).
2. Collagen Molecular Structure. URL: <https://www.news-medical.net/health/Collagen-Molecular-Structure.aspx> (Date of access: 26.10.2023).
3. Mienaltowski M. J., Birk D. E. Structure, physiology, and biochemistry of collagens. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2014. V. 802. P. 5–29.
4. Ramshaw J., Shah N., Brodsky B. Gly-X-Y tripeptide frequencies in collagen: a context for host-guest triple-helical peptides. *J. Struct. Biol.* 1998. Vol. 122. P. 86–91.
5. Collagen. URL: <https://my.clevelandclinic.org/health/articles/23089-collagen> (Date of access: 26.10.2023).
6. Best Types of Collagens and Their Bodywide Benefits. URL: <https://ancientnutrition.com/blogs/all/collagen-types> (Date of access: 26.10.2023).
7. Ju H. et al. Comparison of the structural characteristics of native collagen fibrils derived from bovine tendons using two different methods: modified acid-solubilized and pepsin-aided extraction. *Materials*. 2020. T. 13. №. 2. P. 358.
8. León-López A. et al. Hydrolyzed collagen – Sources and applications. *Molecules*. 2019. T. 24. №. 22. P. 4031.
9. Zhang Z., Li G., Shi B. I. Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limed split wastes. *Journal-society of leather technologists and chemists*. 2006. T. 90. №. 1. P. 23.
10. Zhu L. and others. Pig bone collagen peptides promote the proliferation and differentiation of osteoblasts by activating the signaling pathway. PI3K.Akt. *Journal of Functional Foods*. 2020. T. 64. P. 103697.
11. Bechaux J. et al. Workflow towards the generation of bioactive hydrolysates from porcine products by combining in silico and in vitro approaches. *Food Research International*. 2020. T. 132. P. 109123.

12. El-Sayyad A. R. I. et al. Evaluation of the Effect of Solcoseryl on Promotion of Bone Regeneration in Calvarial Bony Defect—An Experimental Pilot study. *Advanced Dental Journal*. 2020. T. 2. №. 1. C. 12–23.

13. Zhang Y. et al. Effect of pretreatment on enzymatic hydrolysis of bovine collagen and formation of ACE-inhibitory peptides. *Food Chemistry*. 2013. T. 141. №. 3. C. 2343–2354.

14. Revalorisation of bovine collagen as a potential precursor of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides based on in silico and in vitro protein digestions. *Journal of Functional Foods*. 2016. T. 24. C. 196–206.

15. Zavareze EdR, Silva CM, Mellado MS, Hernandez CP. Funcionalidade de hidrolisados proteicos de cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas. *Quím. Nova*. 2009. 32. P. 1739–1743.

16. Nokelainen M., Tu H., Vuorela A., Notbohm H., Kivirikko K. I., Myllyharju J. High-level production of human type I collagen in the yeast *Pichia pastoris*. *Yeast*. 2001. 18 (9). P. 797–806.

17. Storublevtsev S. A., Popov V. I., Antipova L. V., Stukalo O. G., Bolgova S. B. Evaluation of the bacteriostatic effect of immobilized on collagen carrier antibiotics and silver ions in provision of the aseptic state of the tissue wounds]. *Gig. Sanit.* 2015. 94 (9). P. 54–57.

18. Veeruraj A., Arumugam M., Balasubramanian T. Isolation and characterization of thermostable collagen from the marine eel fish (*Evenchelys macrura*). *Process Biochem.* 2013. 48 (10). P. 1592–1602.

19. Chattopadhyay S., Raines R. T. Review collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers*. 2014 101 (8). P. 821–833.

20. Avila Rodr guez M. I., Rodr guez Barroso L. G., S nchez M. L. Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications. *Cosmet. Dermatol.* 2018. 17 (1). P. 20–26.

21. Udhayakumar S., Shankar K. G., Sowndarya S., Rose C. Novel fibrous collagen-based cream accelerates fibroblast growth for wound healing applications: in vitro and in vivo evaluation. *Biomater. Sci.* 2017. 5 (9). P. 1868–1883.

22. Wald M , Schwarz K , Rehbein H , Bußmann B , Beermann C. Detection of antibacterial activity of an enzymatic hydrolysate generated by processing rainbow trout by-products with trout pepsin. *Food Chem.* 2016. 205. P. 221–228.

23. Collagen effective in wound closure. URL: <https://www.sciencedaily.com/releases/2019/07/190708140044.htm> (Date of access: 05.11.2023).

24. Sajna K. V., Gottumukkala L. D., Sukumaran R. K., Pandey A. White biotechnology in cosmetics. *In Industrial Biorefineries and White Biotechnology.* 2015 P. 607–652.

25. Cortial D., Gouttenoire J., Rousseau C.F., Ronziere M.C., Piccardi N., Msika P., Herbage D., Mallein-Gerin F., Freyria A.M. Activation by IL1 of bovine articular chondrocytes in culture within a 3D collagen-based scaffold. An in vitro model to address the effect of compounds with therapeutic potential in osteoarthritis. *Cartilage.* 2006. Vol. 14. P. 631–640.

26. Bhaskar N., Modi V. K., Govindaraju K., Radha C., Lalitha R. G. Utilization of meat industry by products: protein hydrolysate from sheep visceral mass. *Bioresource Technology.* 2007. Vol. 98 (2). P. 388–394.

27. Akram A. N., Zhang C. Extraction of collagen-II with pepsin and ultrasound treatment from chicken sternal cartilage; physicochemical and functional properties. *Ultrasonics Sonochemistry.* 2020. 105053.

28. Ramanathan G., Singaravelu S., Muthukumar T., Thyagarajan S., Perumal P.T., Sivagnanam U. T. Design and characterization of 3D hybrid collagen matrixes as a dermal substitute in skin tissue engineering. *Materials Science and Engineering.* 2017. 201772. P. 359–370.

29. Johnson K. A., Rogers G., Roe S. C., Howlett C. R., Clayton M., Milthorpe M.K., Schindhelm K. Nitrous acid pretreatment of tendon xenografts cross-linked with glutaraldehyde and sterilized with gamma irradiation. *Biomaterials.* 1999. Vol. 20. P. 1003–1015.

30. Skierka, E. and Sadowska, M. The influence of different acids and pepsin on the extractability of collagen from the skin of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chemistry*. 2007. 105(3). P. 1302–1306.
31. Wang, L., Yang, B., Du, X., Yang, Y. and Liu, J. Optimization of conditions for extraction of acidsoluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) by response surface methodology. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2008. 9(4). P. 604–607.
32. Wahyuningsih R, Rusman, Nurliyani; Pertiwinigrum, A.; Rohman A.; Fitriyanto N.A.; Erwanto Y. Optimization of acid soluble collagen extraction from Indonesian local “Kacang” goat skin and physico-chemical properties characterization. *Chem. Eng. Trans*. 2018. № 63. P. 703–708.
33. Moraes, M.C. and Cunha, R.L. Gelation property and water holding capacity of heat-treated collagen at different temperature and pH values. *Food Research International*. 2013. 50(1). P. 213–223.
34. Wang, L., Liang, Q., Chen, T., Wang, Z., Xu, J. and Ma, H. Characterization of collagen from the skin of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Food Hydrocolloids*. 2014. 38. P. 104–109.
35. Nagai, T. Characterization of collagen from emu (*Dromaius novaehollandiae*) skins. *Journal of Food Science and Technology*. 2015. 52(4). P. 2344–2351.
36. Kaewdang, O., Benjakul, S., Kaewmanee, T. and Kishimura, H. Characteristics of collagens from the swim bladders of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). *Food Chemistry*. 2014. 155. P. 264–270.
37. Sinthusamran, S., Benjakul, S. and Kishimura, H. Comparative study on molecular characteristics of acid soluble collagens from skin and swim bladder of seabass (*Lates calcarifer*). *Food Chemistry*. 2013. 138(4). P. 2435–2441.
38. Optimization of the Biotechnological Process for Hide Unhairing in Substitution of Toxis Sulfides. URL: <http://surl.li/nfwlp> (Date of access: 05.11.2023).
39. STS Group. URL: <https://stprom.com.ua/ua/p1016459586-reaktor->

[himicheskij-elektricheskim.html](#) (Date of access: 05.11.2023).

40. ZUVER Mega Grinder 9. URL: <https://gastro24.com.ua/kuter-zuver-mega-grinder-6> (Date of access: 05.11.2023).

41. STS Group. URL: <https://stprom.com.ua/ua/p1016461370-reaktor-nerzhaveyuschij.html> (Date of access: 05.11.2023).

42. АТ «СМНВО-Інжиніринг». URL: <https://frunze.com.ua/produkcija-3/centrifugi/> (Date of access: 05.11.2023).

43. ОТП-102К-01. URL: <http://surl.li/nfwme> (Date of access: 05.11.2023).

44. СС-100. URL: <https://cryovit.com> (Date of access: 05.11.2023).

45. Beuth Verlag GmbH. *Cleanroom technology — Surface cleanliness*. Berlin: VDI 2083 part 2:1996.

46. Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 06.07.2022 р. № 1169.



## ДОДАТОК А






МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ  
ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ  
ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ  
УНІВЕРСИТЕТ

КАФЕДРА БІОТЕХНОЛОГІЇ



# СЕРТИФІКАТ

*учасника*

№434

Цим засвідчується, що

**Харченко Є. В.**

брав(ла) участь у роботі III Міжнародної  
науково-практичної інтернет-конференції

**«ПРОБЛЕМИ ТА ДОСЯГНЕННЯ  
СУЧАСНОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ»**

(тривалість - 8 год)

24 березня 2023 р., м. Харків, Україна

В.о. ректора НФаУ,  
д. фарм. н., проф.

Проректор з НГР,  
д. фарм. н., проф.

Завідувачка кафедри  
біотехнології НФаУ,  
д. фарм. н., проф.

Алла КОТВИЦЬКА

Інна ВЛАДИМИРОВА

Наталія ХОХЛЕНКОВА

## **ДОДАТОК Б**

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
КАФЕДРА БІОТЕХНОЛОГІЇ**

**MINISTRY OF HEALTH OF UKRAINE  
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY  
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY**

**ПРОБЛЕМИ ТА ДОСЯГНЕННЯ  
СУЧАСНОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ**

**PROBLEMS AND ACHIEVEMENTS  
OF MODERN BIOTECHNOLOGY**

**Матеріали  
III міжнародної науково-практичної  
Інтернет-конференції**

**Materials  
of the III International Scientific and Practical  
Internet Conference**

**ХАРКІВ  
KHARKIV  
2023**

УДК 615.1: 615.3: 615.012.6: 57

Електронне видання мережне

**Редакційна колегія:** проф. Котвіцька А. А., проф. Владимірова І. М., проф. Хохленкова Н.В., доц. Калюжная О.С., доц. Двінських Н.В.

Проблеми та досягнення сучасної біотехнології: матеріали III  
С 89 міжнародної наук.-практ. інтернет-конф. (24 березня 2023 р., м. Харків).  
– Електрон. дані. – Х. : НФаУ, 2023. – 443 с. – Назва з тит. скрана.

Збірка містить матеріали науково-практичної конференції, тематика якої охоплює такі напрями: фармацевтична та медична біотехнологія, перспективні біологічно активні речовини, харчова біотехнологія, продукти здорового харчування, екологічна біотехнологія, природоохоронні технології, біотехнологія у рослинництві, тваринництві та ветеринарії, сучасні біотехнології для народного господарства, розробка, виробництво, забезпечення та контроль якості лікарських засобів, мікробіологічні дослідження на етапах розробки, виробництва та контролі якості харчових продуктів, ветеринарних та лікарських препаратів, організаційно-економічні аспекти діяльності біотехнологічних та фармацевтичних підприємств у сучасних умовах, маркетингові дослідження у біотехнології та фармації, теорія та практика підготовки здобувачів вищої освіти спеціальності «Біотехнології та біоінженерія».

Для широкого кола науковців, магістрантів, аспірантів, докторантів, співробітників біотехнологічних та фармацевтичних підприємств та фірм, викладачів вищих навчальних закладів наукових і практичних працівників фармації та медицини.

Автори опублікованих матеріалів несуть повну відповідальність за підбір, точність наведених фактів, цитат, економіко-статистичних даних, власних імен та інших відомостей. Матеріали подаються мовою оригіналу.

УДК 615.1: 615.3: 615.012.6: 57

## Продовження додатка Б

групі. Хоча вони зрештою заразилися після повторних контактів, але вакциновані тварини повністю контролювали інфекцію – не було жодних ознак або симптомів захворювання, а також були відсутні рівні вірусу, які визначаються, в крові.

В майбутньому плануються дослідження на різних видах тварин, що дозволить препарату перейти на стадію клінічних досліджень на людях. Вже можна говорити про ефективність вакцини, але немає остаточного висновку щодо лікарської форми препарату. На даний час вакцина доставляється безпосередньо на слизову оболонку у вигляді крапель, але розглядаються й інші методи доставки, які можуть бути ефективнішими.

### **Застосування препаратів колагену у галузі біомедицини**

**Харченко Є.В., Охмат О.А.**

Кафедра біотехнології, шкіри та хутра

Київського національного університету технологій та дизайну, м. Київ, Україна

[liza.kharchenko@ukr.net](mailto:liza.kharchenko@ukr.net)

Останні роки спостерігається тенденція зростання світового ринку препаратів колагену. Зростання обумовлене розширенням галузей використання продуктів, що вміщують у своєму складі колаген. Не виключенням є і галузь біомедицини, яка охоплює такі аспекти, як лікування ран, виразок або опіків, відновлення тканин, лікування остеоартриту, хірургію, імплантацію тощо.

Застосування знайшли колагенвмісні продукти у вигляді порошків, гелів, мазей, волокон, пов'язок, плівок, губок, ниток, труб, шовного матеріалу тощо.

Колагенвмісні гелі та губки використовують для прискорення загоювання раневих поверхонь через регенерацію епітеліальних тканин. В офтальмології застосовують колагенові екрани як систему доставки активних фармацевтичних інгредієнтів. Перспективним вважають і використання колагену при трансплантації шкіри та можливості створення «платформи» для росту нової

## Продовження додатка Б

тканини на ушкодженій ділянці. Широкою є практика застосування колагену при імплантації у стоматології та хірургії, створенні штучних суглобів та клапанів. Досліджується можливість застосування колагену для зменшення болю у хворих з ревматоїдним артритом. У дослідженні, опублікованому в журналі «Nature Materials» у 2020 році, доведена доцільність використання колагенових гідрогелів для регенерації кісткової тканини та лікування остеопорозу.

Постійний інтерес до застосування препаратів колагену для біомедичних цілей заснований на біосумісності препаратів та тканин організму людини.

### Біотехнології у відновленні родючості ґрунтів в Україні після війни

<sup>1</sup>Чайка Т.О., <sup>2</sup>Короткова І.В.

<sup>1</sup>Полтавське відділення академії наук технологічної кібернетики України,  
м. Полтава, Україна

<sup>2</sup>Полтавський державний аграрний університет, м. Полтава, Україна  
chayka\_ta@ukr.net

Війна в Україні наразі є причиною не лише загибелі військового та цивільного населення, руйнування інфраструктури, еміграції населення, знищення економіки тощо, а й екоциду. Особливої уваги, з огляду на аграрний статус України, заслуговує забруднення сільськогосподарських ґрунтів внаслідок воєнних дій, які зазнають фізичних, хімічних і біологічних порушень. В результаті родючість ґрунтів знижується або взагалі втрачається, а з урахуванням того, що понад 30 % усіх оброблюваних земель зазнали негативного впливу воєнних дій, то очікувати їх відновлення природних шляхом неможливе, оскільки це може зайняти декілька століть.

Після проведення технічних заходів щодо гуманітарного розмінування, засипання воронок/вирв від вибуху снарядів, проведення аналізу на вміст забруднюючих речовин та здійснення заходів щодо відновлення структури ґрунту внаслідок його ущільнення, доцільно провести біологічні способи очищення ґрунту від важких металів. Наприклад, методи біоремедіації

## Продовження додатка Б

|  |     |
|--|-----|
| <b>Біохімічні показники крові мишей<br/>за споживання кафетерійної дісти та проростків броколі</b><br>Ткачик А.А., Балацький В.А., Іваночко М.В., Байляк М.М.....  | 374 |
| <b>Терапія зволоження ока: дослідження ринку<br/>лікарських засобів в Україні</b><br>Томашевська Ю.О., Кривов'яз О.В., Кривов'яз С.О., Кудря В.В. ....   | 376 |
| <b>Механізми та роль взаємодії бактеріофагів з мікробною культурою</b><br>Торяник І.І. ....  | 377 |
| <b>Застосування методу Аппельмана у визначенні<br/>літичної активності бактеріофагів<br/>(сутність, аналіз перспектив в екстремальних умовах війни)</b><br>Торяник І.І. ....   | 378 |
| <b>Дослідження фізіологічних та біохімічних характеристик<br/>фаз росту <i>Pseudomonas aureofaciens</i><br/>за умов періодичного культивування</b><br>Труфанов О.В., Труфанова Н.А., Торяник І.І., Петренко О.Ю. ....  | 380 |
| <b>Біотехнологічні аспекти розробки і зберігання<br/>тканинно-інженерних конструкцій<br/>на основі мезенхімальних стовбурових клітин</b><br>Труфанова Н.А., Рогульська О.Ю., Губеня О.С., Труфанов О.В.,<br>Кот Ю.Г., Ревенко О.Б., Мазур С.П., Петренко О.Ю. .... | 382 |
| <b>Можливості використання мікробного екзополісахариду<br/>курдлану у фармації та медицині</b><br>Федоровська М.І. ....  | 384 |
| <b>Система доставки ліків комбінованої терапії</b><br>Франчук Є.Р., Бєлих І.А. ....  | 386 |
| <b>Розробка вакцини проти вірусу імунодефіциту людини</b><br>Франчук Є.Р., Бєлих І.А. ....   | 388 |
| <b>Застосування препаратів колагену у галузі біомедицини</b><br>Харченко Є.В., Охмат О.А. ....   | 390 |
| <b>Біотехнології у відновленні родючості ґрунтів<br/>в Україні після війни</b><br>Чайка Т.О., Короткова І.В. ....  | 391 |
| <b>Перспективи використання пробіотиків<br/>у інноваційних лікарських та косметичних засобах</b><br>Чаркова А.П., Рибалкін М.В. ....   | 393 |
| <b>Оцінка динаміки накопичення <math>\beta</math>-каротину в клітинах<br/><i>D. salina</i> залежно від складу середовища культивування</b><br>Чернобай Н.А., Возовик К.Д., Шевченко Н.О. ....  | 394 |
| <b>Експериментальне обґрунтування застосування<br/>птиці розроблених пробіотичних препаратів</b>   |     |