

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ТЕХНОЛОГІЙ  
ТА ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій

Кафедра біотехнології, шкіри та хутра

**Дипломна магістерська робота**

на тему «Способи отримання та перспективи застосування  
**колагену типу 1»**

Виконала: студентка 2 курсу, групи М2ЗБТ-20  
Спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія  
освітньої програми  
Біотехнологія високомолекулярних сполук  
Анастасія СТУЖУК

Керівник: к.т.н., доц. Леся МАЙСТРЕНКО

Рецензент: к.б.н., доц. Ольга ЮНГІН

Київ 2021

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ТЕХНОЛОГІЙ  
ТА ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій  
Кафедра біотехнології, шкіри та хутра  
Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія  
Освітня програма Біотехнологія високомолекулярних сполук

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Завідувач кафедри біотехнології,  
шкіри та хутра  
д.т.н., проф. Олена МОКРОУСОВА

---

«\_\_\_» грудня 2021 року

**ЗАВДАННЯ**

**НА ДИПЛОМНУ МАГІСТЕРСЬКУ РОБОТУ СТУДЕНТУ**

**Стужук Анастасії Юрївні**

1. Тема роботи **Способи отримання та перспективи застосування колагену типу 1**

науковий керівник роботи к.т.н., доц. Леся МАЙСТРЕНКО

затверджені наказом вищого навчального закладу від

«04» жовтня 2021 року № 286

2. Строк подання студентом роботи \_\_\_\_\_

3. Вихідні дані до роботи: завдання на дипломну магістерську роботу; наукова література щодо структури, властивостей, способів вилучення та сфер застосування колагену у біомедичній практиці, матеріали науково-дослідної та переддипломної практик

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

### 5. Консультанти розділів дипломної магістерської роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 1	Леся МАЙСТРЕНКО, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра		
Розділ 2	Леся МАЙСТРЕНКО, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра		
Розділ 3	Леся МАЙСТРЕНКО, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра		

6. Дата видачі завдання 04.10.2021 р.

### КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів дипломної магістерської роботи	Терміни виконання етапів	Примітка про виконання
1	Вступ		
2	Розділ 1. Огляд літератури		
3	Розділ 2. Технологічна частина		
4	Розділ 3. Контроль якості		
5	Висновки		
6	Оформлення дипломної магістерської роботи		
7	Подання дипломного дипломної магістерської роботи на кафедру для рецензування		
8	Перевірка дипломної магістерської роботи у наявність ознак плагіату		
9	Подання дипломної магістерської роботи у відділ магістратури для перевірки виконання індивідуального навчального плану		
10	Подання дипломної магістерської роботи на затвердження завідувачу кафедри		

Студент \_\_\_\_\_ Анастасія СТУЖУК

Науковий керівник роботи \_\_\_\_\_ Леся МАЙСТРЕНКО

Директор НМЦУПФ \_\_\_\_\_ Олена ГРИГОРЕВСЬКА

## АНОТАЦІЯ

Стужук А.Ю. Способи отримання та перспективи застосування колагену типу 1. – Рукопис.

Дипломна магістерська робота за спеціальністю 162 – Біотехнології та біоінженерія. – Київський національний університет технологій та дизайну, Київ, 2021 р.

Дипломна магістерська робота присвячена вивченню способів отримання та перспектив застосування колагену типу 1 у різних галузях промисловості. У роботі наведено критичний огляд літературних джерел, присвячених застосуванню та отриманню колагену, обґрунтовано технологічну схему отримання сухого препарату колагену з відходів шкіряного виробництва за допомогою *Bacillus subtilis*, яка передбачає, в тому числі, стадії отримання посівного матеріалу, вирощування культури та культивування, поділ отриманого гідролізату на фракції та фільтрацію.

Обґрунтовано вибір технологічного обладнання для реалізації виробництва.

Дипломна робота включає біотехнологічні аспекти отримання колагену типу 1 та опис методів контролю стадій його виробництва та готового продукту.

*Ключові слова: колагени, колаген типу 1, Bacillus subtilis, властивості препарату колагену, контроль якості.*

## ABSTRACT

Stuzhuk A.Y. Methods of obtaining and further possibilities for the usage of collagen type 1. – Manuscript.

Master's thesis work in specialty 162 – Biotechnology and bioengineering. – Kyiv National University of Technology and Design, Kyiv, 2021.

The master's thesis is devoted to the study of methods of obtaining and prospects for the use of collagen type 1 in various industries. The thesis provides a critical review of the literature on the usage and production of collagen, substantiates the technological scheme of obtaining of a dry preparation of collagen from leather waste using *Bacillus subtilis*, which includes, inter alia, stages of seed production, cultivation, separation of hydrolyzate on fractions and filtration.

The choice of technological equipment for the realization of production is substantiated.

Thesis includes biotechnological aspects of obtaining of collagen type 1 and a description of methods for controlling the stages of its production and finished product.

*Key words: collagen, collagen type 1, Bacillus subtilis, properties of collagen preparation, quality control.*

## ЗМІСТ

	Стор.
<b>ВСТУП</b> .....	7
<b>РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ</b> .....	10
1.1 Колаген як біологічний об'єкт .....	10
1.2 Значення колагену для організму людини .....	11
1.3 Структура та види колагену .....	15
1.4. Перспективи використання колагену типу I в різних галузях промисловості .....	19
1.4.1 Використання колагену в харчовій промисловості .....	23
1.4.2 Використання колагену в косметичній галузі .....	24
1.4.3 Використання колагену у ветеринарії .....	26
1.4.4 Використання колагену в технології лікарських засобів .....	26
1.4.4.1 Дерматологічні і очні лікарські плівки на основі колагену ..	31
1.4.4.2 Мазі на основі колагену .....	33
1.4.4.3 Колагенвмісні препарати у формі супозиторіїв .....	34
1.4.5 Використання колагену у медичній галузі .....	35
<b>РОЗДІЛ 2 ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА</b> .....	40
2.1 Характеристика цільового продукту .....	40
2.2 Характеристика біологічного агента .....	42
2.3 Обґрунтування способів отримання колагену .....	45
2.4 Обґрунтування способу виділення та очищення .....	48
2.5 Поетапно наведена блок-схема досліджуваної технології ...	51
2.6 Опис технологічної схеми отримання порошкоподібного препарату колагену .....	55
<b>РОЗДІЛ 3 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ</b> .....	65
3.1 Методи контролю препаратів колагену на стадії отримання	65
3.2 Методи контролю готового продукту .....	67
<b>ВИСНОВКИ</b> .....	75
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</b> .....	76
<b>ДОДАТКИ</b> .....	83

## ВСТУП

Колаген – фібрилярний білок, що становить основу сполучної тканини організму (сухожилля, кістки, хрящі, дерма тощо) й забезпечує її міцність та еластичність. Колаген присутній у всіх організмах – від вірусів до багатоклітинних. Колагенові структури не виявлено лише у рослин.

Лише у 30-х роках минулого століття з'явився перший доказ того, що колаген має постійну структуру на молекулярному рівні. З того часу багато видатних учених, включаючи Нобелівських лауреатів, таких як Френсіс Крік, Лайнус Полінг, Олександр Річ, Ада Йонат, Хелен Берман, Вілеайнур Рамачандран, працювали над розшифруванням будови мономеру колагену. Декілька моделей, що суперечать одна одній (попри відому структуру кожного окремого пептидного ланцюга) обґрунтували створення троїчно-спіральної моделі, що пояснила четвертинну структуру молекули колагену. Колаген становить до 30% загального білкового складу тіла ссавців.

Структурна та хімічна стабільність колагену, його фізичні особливості зумовлені унікальною організацією триспиральної макромолекули, появою та утворенням тривимірної мережі міжмолекулярних зв'язків різної природи. Амінокислотний склад колагену відрізняється від складу всіх інших білків. Він характеризується присутністю оксипроліну та оксилізіну, які у складі інших білків не зустрічаються. Ці амінокислоти відіграють надзвичайно важливу роль у стабілізації триспиральної конформації молекул білка. Колагени є найбільш поширеною групою тваринних білків. Будучи за своїм складом структуральними протеїнами, вони є головним органічним компонентом системи підтримки тваринного організму, кісток, хрящів, зв'язок, сполучної тканини та шкіри.

**Актуальність теми** зумовлена підвищеним попитом на колагенвмісні препарати, які використовуються в різних галузях промисловості. Завдяки поширеності та недороговартісності запропонованої колагенвмісної сировини – відходів шкіряного виробництва, може бути отриманий

конкурентоспроможний продукт при зниженні негативного впливу на навколишнє середовище.

**Наукова новизна.** На сьогоднішній день проблема пошуку нових методів та сировини для отримання пептидів є надзвичайно актуальною і викликає інтерес науковців у всьому світі. З огляду на це, існує безліч досліджень використання відходів шкіряної, харчової, рибної промисловостей для переробки їх з метою отримання цінних біологічно активних речовин. Вирішення цього питання зможе подолати відразу дві проблеми: утилізація великої кількості відходів та дефіцит сировини для отримання пептидів, ліпідів, амінокислот. У даній роботі вперше розглянуто технологічну схему отримання колагену типу 1 з відходів шкіряної промисловості.

**Мета і завдання дослідження.** Метою роботи є розроблення технологічної схеми отримання колагену типу 1 з відходів шкіряної промисловості.

Для досягнення мети роботи поставлено і вирішено такі **завдання**:

- критичний аналіз літературних джерел, присвячених вивченню властивостей та способів отримання колагену типу 1;
- опис властивостей біологічного агента та цільового продукту;
- обґрунтування способу отримання колагену типу 1;
- обґрунтування способу виділення та очищення готового продукту;
- опис методів контролю на стадії отримання продукту;
- опис методів контролю готового продукту;
- формулювання висновків.

**Об'єкт дослідження** – властивості та способи отримання колагену типу 1.

**Предмет дослідження** – технологічна схема отримання колагену типу 1 та методи контролю якості отриманого продукту.



**Практичне значення отриманих результатів.** Практичне значення даної роботи полягає у розробленні технологічної схеми отримання колагену типу 1 з відходів шкіряного виробництва.

**Апробація результатів роботи.** Роботу апробовано на двох конференціях міжнародного рівня: I Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології», 25 березня 2021 р., м. Харків; 87 Міжнародній науковій конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті», 15-16 квітня 2021 р., м. Київ.

**Перелік публікацій:**

1. **Стужук А.Ю.,** Майстренко Л.А. Колагенвмісні препарати біомедичного призначення : матеріали I міжнародної наук.-практ. інтернет-конф. ( «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології» 25 березня 2021 р., м. Харків). Х. : НФаУ, 2021. С. 318-319.

2. Ластовецька Л., Маслак В., **Стужук А.** Екстрагування колагену біомедичного призначення з відходів шкіряного виробництва : матеріали 87 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті» (15-16 квітня 2021 р. , м. Київ). Київ: НУХТ. 2021, Ч.1. С. 407.

Основна частина дипломної магістерської інженерної (теоретично-аналітичної) роботи викладена на 75 сторінках і включає: вступ, три основні розділи, висновки. В роботі представлено список використаних джерел та додатки. Список використаних джерел налічує 78 найменувань. Два додатки, що ілюструють виконання індивідуального плану магістра, представлені на 7 сторінках.

## РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1 Колаген як біологічний об'єкт

Колаген – основний структурний білок міжклітинного матриксу. Він становить від 25 до 33% від загальної кількості білків в організмі, тобто близько 6% маси тіла ссавців. Назва «колаген» поєднує сімейство близьких фібрилярних білків, які є основним білковим елементом шкіри, кісток, сухожиль, хряща, кровоносних судин, зубів [71].

У різних тканинах містяться різні типи колагену, але це, в свою чергу, визначається тією роллю, яку колаген виконує у конкретному органі чи тканині. Наприклад, у пластинчастій кістковій тканині, з якої побудовано більшість плоских та трубчастих кісток скелета, колагенові волокна мають строго орієнтований напрямок – поздовжній у центральній частині пластинок, поперечний і під кутом – у периферійній. Це сприяє тому, що навіть при розшаруванні пластинок фібрили однієї пластинки можуть продовжуватися в сусідні, створюючи таким чином єдину волокнисту структуру кістки. Поперечно орієнтовані колагенові волокна можуть вплітатися у проміжні шари між кістковими пластинками, завдяки чому досягається міцність кісткової тканини. У сухожиллях колаген утворює щільні паралельні волокна, які дозволяють цим структурам витримувати великі механічні навантаження [71].

У хрящовому матриксі колаген утворює фібрилярну мережу, яка надає хрящу міцності, а в рогівці ока колаген бере участь в утворенні гексагональних ґрат десцеметових мембран, що забезпечує прозорість рогівки, а також участь цих структур у заломленні світлових променів. У дермі фібрили колагену орієнтовані таким чином, що формують мережу, особливо добре розвинену в ділянках шкіри, які зазнають сильного тиску (шкіра підшв, ліктів, долонь), а в ранах, що гояться, вони агреговані досить хаотично.

Колаген становить до 30% від загального білкового складу тіла ссавців. Структурна та хімічна стабільність колагену, його фізичні особливості зумовлені унікальною організацією триспиральної макромолекули, появою та утворенням тривимірної мережі міжмолекулярних зв'язків різної природи. Амінокислотний склад колагену відрізняється від складу всіх інших білків. Він характеризується присутністю оксипроліну та оксилізіну, які у складі інших білків не зустрічаються. Ці амінокислоти відіграють надзвичайно важливу роль у стабілізації триспиральної конформації молекул білка. Продуктом денатурації колагену є желатин. Температура денатурації макромолекули колагену близька до температури фібриллогенезу [69].

В даний час описано 28 типів колагену, які кодуються більш ніж 40 генами. Вони відрізняються один від одного за амінокислотною послідовністю, а також за ступенем модифікації – інтенсивністю гідроксилювання чи глікозилювання. Спільним для всіх колагенів є існування одного або більше доменів, що містять потрібну спіраль та присутність їх у позаклітинному матриксі. Більше 90% всього колагену вищих організмів займають колагени I, II, III і IV типів [69].

## **1.2 Значення колагену для організму людини**

Колаген – це волокнистий білок, що міститься в тілі, в органах, м'язах, шкірі, волоссі, нігтях, зубах, кістках, кровоносних судинах, сухожиллях, суглобах, хрящах й травній системі. Існують 28 різних типів, у яких різний спектр функціонування, але більшість колагену (до 90%) це колаген типу I. Колаген типу I зустрічається в шкірі, кістках, органах, очах і в травному тракті [58].

Починаючи приблизно з 35 років, вироблення колагену природним чином починає сповільнюватися, що може мати найрізноманітніші негативні наслідки для організму. До 40 років він починає витрачатися швидше, ніж організм може його відтворити, а до 60 років ситуація ще більше погіршується. Крім старіння, багато інших чинників впливають на рівень

колагену. До них відносяться: генетика, паління, забруднення навколишнього середовища, надмірне перебування на сонці та брак поживних речовин. Вживання відповідних біологічно активних добавок та продуктів харчування в щоденному раціоні має важливе значення для здоров'я і функціонування організму.

Користь пептидів й амінокислот, які є в складі колагену, для здоров'я була добре вивчена. На сьогоднішній день доведені наступні позитивні дії колагену на організм [58]:

*1. Здоров'я шкіри.* Калаген використовують в якості інгредієнта в косметичних продуктах для шкіри обличчя, і, згідно з численними науковими дослідженнями, прийом колагенових добавок перорально має численні переваги для шкіри, включаючи поліпшення її зволоження та еластичності.

*2. Здоров'я суглобів і кісток.* З віком організм починає втрачати колаген, і це може мати негативний вплив на опорно-рухову систему. Суглоби починають напружуватися й опухати, в результаті чого зв'язки і сухожилля рухаються менш вільно. Дослідження показали, що вживання колагену має потенціал для лікування остеоартриту.

*3. Правильне функціонування травної системи.* На відміну від багатьох білкових порошоків, колагенові пептиди легко засвоюються організмом і є ефективним способом підвищення споживання білка. Амінокислоти, що містяться в колагені, також надають седативні та лікувальні властивості для травної системи. Гліцин фактично стимулює вироблення шлункової кислоти і покращує засвоєння поживних речовин. Доповнення раціону колагеном може підвищити метаболізм та рівень енергії. Амінокислота гліцин, присутня в ньому, сприяє переносу цукру в тканини, що, в свою чергу, підвищує рівень енергії, а також стимулює розвиток м'язів.

*4. Позитивний вплив на зуби і нігті.* Крім того колаген, що є основним компонентом шкіри та кісток, є також ключовим будівельним матеріалом для зубів та нігтів. Додавання колагену в щоденний раціон може підвищити їх силу та здоров'я.

5. *Детоксикація організму.* Колаген для схуднення: існують численні детокс-дієти, які сприяють тому, що гліцин допомагає відновити печінку і мінімізувати будь-які пошкодження, викликані токсичними речовинами.

Синтез колагену та його екскреція у позаклітинний матрикс здійснюють майже усі бластні клітини: хондробласти, остеобласти, епітеліальні клітини та ендотеліальні клітини, але найчисленнішим типом клітин, що синтезують колаген, є фібробласти. Утворення колагенових фібрил – складний багатоступінчастий процес, який включає кілька стадій, які проходять як всередині клітини, так і поза нею.

На внутрішньоклітинному етапі відбувається трансляція та посттрансляційна модифікація поліпептидних ланцюгів, а на позаклітинному – білкова модифікація, що призводить до утворення колагенових волокон. Процес синтезу колагену починається на полірибосомах грубої ендоплазматичної сітки, де відбувається трансляція амінокислотних залишків і відбувається збирання пептидних ланцюгів [46]. Пептидні ланцюги, синтезовані на рибосомах, завдяки наявності гідрофобного сигнального сайту на N-кінці, проникають через мембрану в порожнину ендоплазматичної сітки, де сигнальний пептид розщеплюється за участю специфічної протеїнази. У порожнині ендоплазматичної сітки відбувається ряд посттрансляційних модифікацій незрілого колагенового ланцюга. Зокрема, під дією залізовмісного колагену проліландлізилгідроксилази (проколагенпроліл-4-діоксигеназа, проколагенпроліл-3-діоксигеназа та проколаген лізил-5-діоксигеназа) деякі залишки проліну та лізину гідроксильються з утворенням гідроксипроліну та гідроксилізину [40]. Цей процес починається в цистернах ендоплазматичної сітки під час трансляції поліпептидного ланцюга і триває до його відділення від рибосом. Для продовження реакції гідроксильовання необхідні кисень (кисень) та 2-оксоглутарат, а також аскорбінова кислота як кофактор. Також в ендоплазматичній сітці відбувається глікозилування частини залишків гідроксилізину під дією глікозилтрансфераз, внаслідок чого між 5-ОН-

групою гідроксилізину та залишком галактози утворюються ковалентні O-глікозидні зв'язки.

Після гідроксилювання та глікозилювання кожен про- $\alpha$ -ланцюг зв'язується воднем з двома іншими про- $\alpha$ -ланцюгами, утворюючи потрібну спіраль проколагену. Для стабілізації цієї потрібної спіралі колагену необхідний гідроксипролін, оскільки його гідроксильні групи беруть участь у формуванні водневих зв'язків між  $\alpha$ -ланцюгами. Наприкінці гідроксилювання та глікозилювання всі про- $\alpha$ -ланцюги з'єднані між собою водневими зв'язками, а в області С-кінцевих пропептидів утворюються дисульфідні містки. На наступному етапі молекули проколагену з порожнини ендоплазматичної сітки надходять у апарат Гольджі, де вони потрапляють у секреторні гранули, які виводяться у позаклітинний простір. Усі проміжні продукти синтезу колагену, що утворюються на цій стадії, є водорозчинними. У позаклітинному просторі в результаті відшарування специфічними проколагеновими пептидазами N- і С-кінцевих пептидів утворюються молекули тропоколагену (зрілий, нерозчинний колаген), які об'єднуються у мікрофібрили, які, у свою чергу, утворюють колагенові волокна [55]. Просторова організація фібрил завершується за участю фібронектину, протеогліканів та колагенів, пов'язаних з фібрилами. Глікозаміноглікани та утворені за їх участю протеогліканові комплекси вступають у характерні взаємодії з колагеном і утворюють суцільну мережу колагенових фібрил між окремими клітинами. У той же час вільні глікозаміноглікани, не пов'язані з основним білком, діють як інгібітори фібрилогенезу.

Слід зазначити, що не весь тропоколаген перетворюється на фібрили: близько 25% молекул тропоколагену розпадаються, не утворюючи фібрил, а отримані фрагменти виконують сигнальні функції та стимулюють колагеногенез, для якого вони частково є субстратом.

Обмін колагену в тканинах є відносно повільним процесом. Період напіввиведення колагену становить тижні або навіть місяці. Колаген стійкий

до більшості тканинних протеаз та травних ферментів. Для запуску його катаболізму необхідна наявність специфічного ферменту – колагенази, яка розрізає всі три пептидні ланцюги молекули колагену. Розщеплення молекули колагену також може каталізуватися деякими неспецифічними протеазами та металопротеїназами матриксу [48]. Отримані фрагменти розчинні у воді і легко денатурируються лізосомними протеазами до олігопептидів, пептидні зв'язки яких стають доступними для гідролізу різними пептидними гідролазами.

### 1.3 Структура та види колагену

Колаген відноситься до класу білків, які називаються склеропроїнами. Особливістю білків даного класу є їхня філогенетична спорідненість у різних видів тварин і людини. Сам термін "колаген" є збірним. Їм позначають як специфічні мономерні білкові молекули, так і агрегати цих молекул, що утворюють у позаклітинному матриксі сполучної тканини фібрилярні структури.

*Первинна структура* характеризує амінокислотний склад колагену високоспецифічний та різко відрізняється від амінокислотного складу інших білків. Поліпептидний ланцюг молекули колагену складається з 19 амінокислот. Характерно, що кожна третя амінокислота в його молекулі є гліцином: у складі колагену є амінокислоти, що не зустрічаються в інших білках (оксипролін та оксилізін). Їх вміст становить 23% всього амінокислотного складу. У колагені відсутні триптофан, цистин та вкрай низький вміст тирозину та метіоніну [78].

*Вторинна структура.* Присутність в поліпептидному ланцюзі залишків гідроксиамінокислот є характерною особливістю колагену. На одному з кінців молекула колагену зшита поперечними зв'язками, утвореними бічними ланцюгами залишків лізину. Кількість поперечних зв'язків зростає в міру старіння організму при формуванні вторинної структури поліпептидний

ланцюг колагену укладається в більш розгорнуту левозакрученної  $\alpha$ -спіраль (на один виток припадає 3 амінокислотних залишки) [78].

*Третинна структура.* Загальноприйнятим вважається уявлення про молекулу колагену, як про триспіральну спіраль: три окремі поліпептидні ланцюги, згорнуті в лівовинтову спіраль, переплітаються в одну правовинтову суперспіраль (трьохспіральна спіраль). Потрійну спіраль молекули колагену стабілізують водневі зв'язки, що мають міжспіральний характер. Крім того, вона стабілізована комплексом електростатичних та гідрофобних зв'язків, що підтверджується розшифровкою структури окремих ланцюгів. Ця структурна модель молекули, запропонована А. Іч та Ф.Н.Срік (1961) з деякими видозмінами, в даний час загальноприйнята. Складна триспіральна молекула впорядкована таким чином, що вільні бічні ланцюги гліцину кожного поліпептидного ланцюга знаходяться всередині загальної спіралі, а кільця проліну, оксипроліну, і бічні групи амінокислот виступають назовні. У сполучній тканині молекули колагену за рахунок міжмолекулярних поперечних зв'язків об'єднуються у фібрили та волокна, утворюючи складну морфологічну структуру [73].

*Четвертинна структура.* Всередині тропоколагенів є ковалентні зв'язки між ланцюгами, а також деяка непостійна кількість даних зв'язків між самими тропоколагеновими спіралями, створюючими добре організовані структури (наприклад, фібрили). Товстіші пучки фібрил формуються за допомогою білків декількох інших класів, включаючи інші типи колагенів, глікопротеїни, протеоглікани, що використовуються для формування різних типів тканин з різних комбінацій одних і тих же основних білків. Колагенові фібрили — це напівкристалічна структурна одиниця колагену [73].

*П'ятеринна структура.* В пухкій сполучній тканині колагенові волокна розташовані у різних напрямках й мають вигляд хвилястих, спіралью покручених, круглих або плоских тягів товщиною 1-10 мкм. Вони здатні утворювати пучки, товщина яких може досягати 150 мкм. У



нативному вигляді колагенові волокна безбарвні, на гістологічному препараті фарбуються оксифільно, у разі імпрегнації сріблом набирають буро-жовтого кольору. Ці волокна не розгалужуються і не анастомозують між собою. Колагенове волокно побудоване із пучків фібрил, зцементованих глікозаміногліканами та глікопротеїнами. [73].

Всі типи колагену в залежності від структури поділяють на кілька груп: фібрилярні, асоційовані з фібрилами колагену, сіткоподібні, мікрофібрили тощо. Для позначення кожного типу використовують певну формулу, у якій  $\alpha$ -ланцюги позначають арабськими цифрами, а тип колагену – римськими.

Молекули колагенів I, II, III, V, XI типів мають форму фібрил і побудовані зі структурних одиниць – тропоколагенів, молекулярна маса яких становить 300000 Да, довжина 280 нм, товщина 1,4 нм. Молекула тропоколагену побудована з трьох поліпептидних  $\alpha$ -ланцюгів, кожен з яких містить біля 1000 амінокислотних залишків і являє собою щільну лівозакручену спіраль, на один виток якої припадає три амінокислотних залишки, один з яких обов'язково гліцин.

Якщо первинну структуру  $\alpha$ -ланцюгу колагену представити у вигляді схеми  $Gly-x-y$ , то в положенні  $x$  найчастіше зустрічається – пролін і 3-, 4-гідроксипролін, а в положенні  $y$  – інші амінокислоти. Гліцин в даній комбінації необхідний для формування фібрилярної структури, оскільки жодна інша амінокислота не поміщається між трьома поліпептидними ланцюгами в центрі потрійної спіралі. Радикали амінокислот, які займають положення  $x$  і  $y$ , знаходяться на поверхні потрійної спіралі, пролін і гідроксипролін обмежують її обертання. Три  $\alpha$ -ланцюги утворюють структуру, злегка закручену в спіраль.

Формуючи фібрили, молекули тропоколагену розташовуються східчасто, зміщуючись одна відносно одної на  $\frac{1}{4}$  довжини, що надає фібрилам характерної посмугованості, яку можна помітити методом електронної мікроскопії. У мінералізованих тканинах щілини між молекулами тропоколагену заповнені кристалами апатитів.

Молекули тропоколагену утворюють мікрофібрили і фібрили. Мікрофібрили зазвичай складаються з п'яти волокон і формуються в результаті лінійної та бічної агрегації молекул тропоколагену. Ці мікрофібрили разом з різними глікопротеїнами (фібринопектином,  $\alpha 1$ -глікопротеїном, протеогліканами) утворюють фібрили. Молекули глікопротеїнів розташовуються на поверхні фібрил, захищаючи їх від дії колагеназ.

Колаген I типу  $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2$  виявляють у складі шкіри, кісток, дентину, пульпи зуба, цементу, періодонтальних волокон, він бере участь у процесах мінералізації. Колаген II типу  $[\alpha 1(II)]_3$  присутній у хрящах, колаген III типу  $[\alpha 1(III)]_3$  міститься в стінках кровоносних судин. Колаген V типу  $[\alpha 1(V) \alpha 2(V) \alpha 3(V)]$  являє собою гібридну молекулу, яка складається з різних ланцюгів:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  і  $\alpha 3$ .

*Колагени, асоційовані з фібрилами.* До цієї групи належать колагени IX, XII, XIV типів, вони беруть участь в організації міжклітинного матриксу слизової оболонки, хряща і цементу кореня зуба. Колагенові білки цього класу не спроможні формувати фібрили, але, зв'язуючись з фібрилярними колагенами, вони обмежують довжину, товщину та орієнтацію фібрил колагенів I та II типів. В їх структурі наявні як глобулярні, так і фібрилярні домени. Так, наприклад, колаген IX типу  $[\alpha 1(IX) \alpha 2(IX) \alpha 3(IX)]$  складається з трьох фібрилярних і чотирьох глобулярних доменів. Вони об'єднані поперечними ковалентними зв'язками з фібрилами колагену II типу. Завдяки наявності бічного глікозильованого ланцюга і великої кількості позитивно заряджених груп, цей тип колагену може приєднувати до себе негативно заряджені молекули гіалуронової кислоти та хондроїтинсульфату.

*Колагени, що формують мікрофібрили.* До цієї групи належить колаген I типу. Оскільки він являє собою коротко ланцюговий білок, то може розташовуватися між фібрилами інтерстиціальних колагенів і зв'язуватися з ними. У процесі синтезу 2 молекули цього колагену з'єднуються антипаралельно з утворенням димера, з димерів утворюються тетраметри.

Останні зв'язуються «кінець в кінець» з утворенням мікро фібрил. Цей тип колагену, завдяки наявності в поліпептидних ланцюгах послідовності арг-глі-асп, забезпечує клітинну адгезію шляхом приєднання до мембранних адгезивних білків – інтегринів.

*Сіткоподібні (нефібрилярні) колагени.* До цієї групи належать колагени IV, VIII, X типів, вони відрізняються за довжиною та розміром і спроможні формувати сіткоподібні структури. Пептидні ланцюги IV типу колагену  $[\alpha 1(IV)] [\alpha 2(IV)]_2$  не підлягають після секреції протеолітичній модифікації, їх кінцеві домени взаємодіють між собою «кінець в кінець», що призводить до формування димерів і тримерів, а завдяки бічним взаємодіям утворюються тривимірні структури, схожі на сітку.

#### **1.4 Перспективи використання колагену типу 1 в різних галузях промисловості**

В останні роки в засобах масової інформації часто йдеться про колаген як про модний засіб, що повертає молодість шкірі, що надає блиск і міцність волоссю, здоров'я кісткам та суглобам. Однак у медицині та фармацевтичному виробництві, колаген знайшов широке застосування вже давно. Колаген є допоміжною речовиною в технології різних лікарських форм. Колаген розкриває всю фармакологічну гаму властивостей препарату, забезпечує оптимальну дію лікарської речовини, дозволяє знизити концентрацію лікарської речовини за збереження терапевтичного ефекту, знижує токсичність низки лікарських речовин, що дозволяє вводити ці препарати у більшій кількості [58].

Як відомо, під час заморожування та нагрівання розчинів та сумішей, що містять білки, можуть порушуватися гідрофобні взаємодії та водневі зв'язки, які визначають та стабілізують третинну та четвертинну структури. Встановлено, що зміни в гідратаційній оболонці нативних фібрил колагену можуть призвести до зміни їх морфології. Таким чином, при охолодженні на  $1\text{ }^{\circ}\text{C}$  скорочення фібрили колагену становить  $0,1\text{ мкм}$  на  $1\text{ мм}$  довжини, і

відбувається скручування фібрили. Причиною таких конформаційних змін колагену є молекули води, які, охолоджуючись, включаються до колагенового гелісу трьох ліксів, стягують його та згинають. При нагріванні фібрили колагену розмотуються і подовжуються.

Температурний фактор відіграє особливо важливу роль у процесі денатурації колагену. Денатурація колагену відбувається при різних температурах в діапазоні 58-67 °С. Коли температура денатурації досягається, водневі зв'язки колагену, завдяки яким зберігається його третинна структура, слабшають і руйнуються. В результаті зміни структури колагену відбувається збільшення кількості карбоксильних ( $-\text{COOH}$ ) та гідроксильних ( $-\text{OH}$ ) груп, які виконують роль гідрофільних центрів. Ці зміни є незворотними, і саме з них починається фактичний процес денатурації фібрилярного білка. При температурі денатурації колаген трансформується з утворенням сполук з меншою молекулярною масою – пептизацується. Як правило, така високотемпературна денатурація колагену використовується в харчовій промисловості для виробництва желатину, желатози, глютину, які після охолодження утворюють міцні желе. Чим вище вміст залишків амінокислот проліну та гідроксипроліну, тим вища здатність продуктів теплової обробки колагену до утворення гелю [51].

Застосування колагену в медицині, біотехнології, біоінженерії, сільському господарстві, харчовій та косметичній промисловості викликає значний інтерес. Завдяки своїй структурній спорідненості з тканинами та органами людини, його здатності легко метаболізуватися та утилізуватися організмом, колаген вважається одним із найперспективніших біополімерів для використання у відновлювальній та реконструктивній хірургії з метою усунення дефектів шкіри, деформуючих рубців, пігментації, а також для загоєння ран різного походження, включаючи обширні опікові рани, операції на сухожиллях, травми м'язів тощо [39]. Цілющі властивості препаратів колагену пов'язані з його кровоспинним та ранозагоювальним ефектом у поєднанні з відсутністю антигенності. Фармацевтична промисловість

розробила і широко використовує в медицині різні засоби: м'які та рідкі лікарські форми, спеціальні пластирі, плівки, нитки, трубки та губки, імпланти для ортопедії та офтальмології (імплантати зі склоподібного тіла), травматології, щелепно-лицевої хірургії тощо. На основі ліофілізованого колагену створено ряд харчових добавок, рекомендованих до прийому в післяопераційний період, після травм, а також як доповнення до харчування під час занять спортом.

Тривають роботи з вивчення можливості використання продуктів гідролізу колагену як матриці для іммобілізації біологічно активних речовин (наприклад, антибіотиків) з метою створення нових ефективних препаратів [47]. Цей напрямок є дуже перспективним, враховуючи велику кількість активних функціональних груп у поліпептидних ланцюгах молекули колагену.

Введення колагену шляхом ін'єкцій (підшкірно, внутрішньошкірно, внутрішньом'язово, внутрішньосуглобово) має лише тимчасовий ефект, оскільки він не може бути включений до колагенових волокон тканини пацієнта. Крім того, при введенні препаратів, що містять молекули білка, існує ризик зараження вірусами, виникнення імунологічної реакції тощо. Пояснюється тимчасовий позитивний ефект таких ін'єкцій, що виражається у збереженні об'єму тканини (шкіри) та її пружності, завдяки здатності колагену зв'язувати та утримувати воду шляхом зволоження та набухання. Хоча колаген містить переважно залишки амінокислот з неполярними радикалами, він здатний зв'язувати досить велику кількість води через утворення водневих зв'язків між його пептидними групами та молекулами води. Однак, на відміну від більшості білків, при розчиненні у воді спочатку набухають, а потім переходять у розчинений стан, колаген, поглинаючи велику кількість води, залишається у набряклій формі, не розчиняючись при цьому [1].

Позитивний вплив колагену та продуктів його гідролізу у різних лікарських формах, харчових добавках та косметичці не обмежується його здатністю утримувати вологу та стимулювати вироблення власного колагену тканинами, як згадувалося вище. *In vivo* колагенові пептиди утворюються у

сполучній тканині в результаті дії ендогенних протеолітичних ферментів. Деякі пептидні фрагменти колагену, як і фрагменти інших білків позаклітинного матриксу (наприклад, фібронектину або еластину), здатні надавати регуляторну дію на клітини тканин, стимулювати або пригнічувати вироблення білків позаклітинного матриксу [42]. Досліди *in vitro* на культурі фібробластів людини показали, що С-кінцевий фрагмент проколагену I типу здатний активувати синтез колагену I та III типу, а також продукцію фібронектину [18]. Пізніше з цього фрагмента була виділена мінімальна пептидна послідовність (*Lys-Tre-Tre-Lys-Ser*), яка має здатність стимулювати вироблення позаклітинного матриксу *in vitro*. Трипептид (*Gly-His-Lys*), який також є фрагментом колагенового  $\alpha$ -ланцюгу, має високу спорідненість з міддю, кофактором таких важливих ферментів, як супероксиддисмутаза та лізилоксидаза (бере участь у виробленні колагену) [42].

Розчинність похідних колагену, їх фізико-хімічні властивості та біологічна активність залежать від джерела та способу отримання. Колаген, що використовується у косметичній та фармацевтичній промисловості, поділяється на три технологічні види. Зазвичай рецептури продуктів вказують на джерело, з якого отримують колаген. На сучасному ринку існує три види колагену: тваринний, морський та рослинний [60]. Щодо останнього продукту, який являє собою гідролізований білок пшениці чи інших злакових культур, що не містить ні гідроксипроліну, ні оксилізіну, назва «колаген» вкрай неправильна і є не що інше, як рекламний хід деяких виробників косметичних засобів та харчових добавок. Більшість продуктів містять колаген тваринного походження, отриманий під час переробки побічних продуктів (кістки, хрящі, шкіра) великої рогатої худоби, свиней та деяких інших ссавців та птахів [60]. Останнім часом на ринку з'являється все більше косметичних засобів, що містять так званий морський колаген. Він виділений з різних водних організмів, але переважно зі шкіри та луски риб (і, в основному не з морських, а з прісноводних видів). Перехід до цього джерела пояснюється тим, що, по-перше, морський колаген більше подібний

до людського, ніж тваринний [37]. По-друге, через значно нижчу температуру денатурації (20-28 °C), коли косметичні засоби, що містять великі фрагменти молекул морського колагену, наносяться на шкіру, вони розпадаються на пептиди, досить дрібні для безперешкодного проникнення в шкіру. По-третє, і це не маловажливо, через підвищений ризик зараження людини різними вірусними та пріонними інфекціями від великої рогатої худоби та свиней багато виробників відмовляються використовувати тваринний колаген у своїх рецептурах та переходять на морський колаген.

Іноді у складах різних продуктів, найчастіше в медичних цілях, використовуються штучно синтезовані пептиди, відповідні за амінокислотою послідовністю фрагментам колагенових  $\alpha$ -ланцюгів. Виробники називають ці речовини мікроколагенами. Прикладом може служити синтетичний олігопептид з гемостатичними властивостями, що відповідає фрагменту колагенового  $\alpha$ -ланцюга з 36 амінокислотних залишків [35]. Цей пептид може утворювати потрібну спіраль і насичуватися водою до утворення гідрогелю, який також має здатність зв'язувати тромбоцити, викликаючи їх агрегацію, не викликаючи запальної реакції. Це дозволяє використовувати речовину як кровоспинний засіб.

#### **1.4.1 Використання колагену в харчовій промисловості**

Одним з компонентів, який почав активно застосовуватися в інгредієнтах харчових продуктів, в останні роки став колаген. Незважаючи на те, що він не містить повного набору незамінних амінокислот, його застосування в раціоні харчування сприяє поліпшенню здоров'я шкіри, нігтів, сполучних тканин в організмі. Крім того, колаген є економічно вигідним у використанні, має стійкість до термічного впливу і тривалого зберігання. З точки зору харчування, колаген та желатин є білками низької якості, тому що вони не містять всіх незамінних амінокислот, необхідних людині – це неповноцінні білки.

У харчовій промисловості колаген та його гідролізати використовуються в виробництві желатину, для освітлення вин, отримання харчових плівкових покриттів і їстівних оболонки, як структуроутворювач, при виробництві штучної ікри, бульйонів, холодців, соусів, різних оздоровчих напоїв та коктейлів та як добавки в хлібопекарському та кондитерські виробництва [5**Ошибка! Источник ссылки не найден.**].

Колаген дуже погано піддається дії травних ферментів та є не повноцінним білком, що пояснюється особливостями амінокислотного складу. Однак останнім часом роль колагену у харчуванні переглянуто. Фізіологічна дія колагену дозволяє віднести його до харчових волокон. У той же час доведено, що при оптимальному поєднанні м'язових білків та колагенів показник чистого засвоєння білка максимальний.

Продукти гідролізу колагену, такі як глютин, желатин та ін. стимулюють секреторну та рухову функції ШКТ, надають позитивний вплив на стан та функціонування корисної мікрофлори кишечника, тому можуть бути використані як аналог харчових волокон.

#### **1.4.2 Використання колагену в косметичній галузі**

Головною властивістю, що зумовлює застосування колагеновмісної сировини в косметології, є його здатність стимулювати вироблення власного колагену та відновлювати колагеновий каркас шкіри (безопераційний ліфтинг), не маскуючи цим проблеми, а усуваючи їхню причину. Саме тому фахівці у галузі естетичної медицини визнають колаген лікувальним: за ефективністю його можна порівняти з ін'єкціями професійних косметологів.

Ефективність косметичних засобів, які містять колаген пояснюється тим, що колаген утворює плівку, яка діє як вологий компрес та призводить до зниження трансепідермальної втрати води шкірою. Завдяки гігроскопічним властивостям колаген підвищує вологість рогового шару шкіри, що дозволяє рахувати косметичні засоби з колагеном геронтопротектором. Найбільшими



виробниками косметики з колагеном є Польща (*Colway, Kolastyna*), Китай (*Hua-shen, TianDe*) та Японія (*Amicolla, Sakura, EJI, EJI-extra, KWC*).

Колаген входить до складу косметичних засобів для забезпечення:

- поверхні шкіри, що володіє пластифікуючими (розгладжує) властивостями, з властивостями вологого компресу;
- подовження (продлонгування) дії екстрактів, олій тощо у складі косметичних композицій;
- надання блиску волоссю, створення колагенового (захисного) шару на поверхні волосини;
- натуральний косметичний колаген гель, заповнюючи недолік колагену в шкірі людини, відновлює темп роботи фібробластів (клітин, що виробляють колаген). Відновлюючи цю функцію, колаген не робить шкіру залежною від косметичного засобу.

Для покращення еластичності шкіри, а також для зміцнення нігтів і волосся було розроблено багато косметичних продуктів, що містять колаген [2]. Одна з властивостей колагену, що визначає його широке використання як сировини в косметиці, обумовлюється його здатністю, точніше, здатністю продуктів його розпаду стимулювати вироблення власного колагену шкірою. Однак, як відомо, для безперешкодного проникнення крізь базальний шкірний бар'єр речовина має бути розчинною у жирі чи воді та мати мікроскопічний розмір молекул.

Через відсутність цих властивостей, нативна молекула колагену не може проникнути в роговий шар епідермісу, а як субстрат для власного синтезу колагену фібробластами можуть бути використані лише продукти його часткового розпаду у вигляді пептидів та амінокислот, які за певних умов можуть проникати глибоко в шкіру. Колаген, зазвичай гідролізований або гідратований, включений до складу багатьох кремів, гелів, масок, шампунів тощо як живильний та зволожуючий інгредієнт. Ефективність вищезгаданої косметики зумовлена, головним чином, тим, що колаген

утворює плівку, яка зменшує трансепідермальні втрати води, тим самим збільшуючи вміст вологи в роговому шарі шкіри [60].

### **1.4.3 Використання колагену у ветеринарії**

Сполучна тканина становить близько 85% маси тіла тварин та визначає фізичні особливості всіх структур та органів: шкіри, кісток, суглобів, зв'язок тощо. До складу сполучної тканини входять міжклітинний матрикс та різні клітини. Основою міжклітинного матриксу є колаген. Від рівня колагену в організмі залежить здоров'я шкіри, краса вовни, здоров'я суглобів, зв'язок, м'язів. В ветеринарії використовується безліч препаратів на основі колагену для лікування та профілактики захворювань тварин [61].

Використання колагену у ветеринарії особливо важливе у післяопераційний період реабілітації та для профілактики зміцнення сполучнотканинного, сухожильного та хрящового апаратів.

Найбільш пристосованими для теплокровних тварин, до яких належать як люди, так і свійські тварини є колагени, отримані саме від теплокровних продуцентів (передусім це свині, велика рогата худоба, вівці та кози). Колагени риб, жаб та акул (хрящових риб) та інших холоднокровних мають дещо іншу структурну поляризацію. Їх колаген напрацьований в інших температурних режимах і адаптований до інших (нижчих) температурних кордонів, ніж у теплокровної тварини.

### **1.4.4 Використання колагену в технології лікарських засобів**

Правильний вибір допоміжних речовин дозволяє знизити концентрацію лікарської речовини за збереження терапевтичного ефекту. Одне з перспективних завдань у технології ліків – це пошук нових допоміжних речовин у складі біоадекватних природних полімерів. Такі допоміжні речовини близькі за структурою тканин та рідин організму, можуть легко метаболізуватися та утилізуватися організмом [74].

Багато білків знижують токсичність низки лікарських речовин, що дозволяє вводити ці препарати в значно більшій дозі. Як такий біоадекватний полімер доцільно використовувати колаген, найбільш поширений і доступний білок тваринного світу [74].

Медико-біологічні властивості колагену – здатність прискорювати загоєння ран, посилювати адгезію тромбоцитів та викликати гемостаз та інші властивості за відсутності антигенності зумовили його широке застосування у реконструктивній хірургії [75].

Фізико-хімічні властивості та мінливість їх залежно від вмісту білка, вологи, рН середовища, наявності зшиваючих агентів, різних електролітів та інших речовин, температури дозволяють вивчати колаген як допоміжну речовину в технології різних лікарських форм. Введення в фармацевтичну технологію нової допоміжної речовини вимагає, перш за все, його стандартної субстанції. З цією метою для отримання лікарських форм на основі колагену розроблено та стандартизовано наступні субстанції:

- 2%-ний розчин колагену;
- маса колагенова;
- колаген сухий фармацевтичний.

*Розчин колагену 2%-ний* є продуктами розчинення в 0,2-0,5 М оцтовій кислоті лужно-обробленої дерми великої рогатої худоби. Молекули колагену в цьому розчині зберігають характерну для нативного білка триспиральну структуру і знаходяться у формі димерів, тримерів і т.д. Оцтова кислота має бактерицидні властивості, і при концентрації більше 0,25 М розчини колагену зберігають властивості при кімнатній температурі тривалий час.

*Маса колагену* – це механічно диспергована нейтральна лужно-оброблена дерма із концентрацією білка 6-10%. Зберігають її у замороженому стані; вона легко розчиняється в оцтовій кислоті і має всі властивості розчину колагену.

*Колаген сухий фармацевтичний* – це ліофільно висушена та додатково подрібнена до дрібних волоконець маса колагену. Він легко регідратується у водно-сольових розчинах з утворенням відповідних субстанцій [76].

Допоміжні речовини у технології ліків повинні нести певні формоутворюючі функції. З цієї точки зору вивчені реологічні, поверхнево-активні (ставлення до жирів, нерозчинних порошків) та плівкоутворюючі властивості диспергованого колагену. Реологічні властивості слабо кислих і слабо лужних дисперсій колагену були вивчені за допомогою віскозиметра. Дисперсії колагену при концентрації білка вище 1,5% представляють тиксотропні в'язкопластичні системи. Реологічні характеристики дисперсій колагену близькі до таких основ, що застосовуються в технології мазей та лініментів [64]. Колаген використовується в основному у формі плівок, губок, волокнистої маси, які одержують з оцтовокислих розчинів колагену після сушіння (губки), дегідратації ацетоном та повітряного сушіння (пористі структури, плівки).

Застосування колагену у фармацевтичній промисловості в технології таких лікарських форм, як мазі, розчини, свічки, обмежене внаслідок того, що після лужно-сольової обробки він розчиняється та набухає у кислотах, лугах, буферних розчинниках, але лише незначно у воді. Введення додаткових компонентів, особливо таких, як кислоти та луки, може впливати на біологічну доступність лікарських речовин, їх хімічну та біологічну сумісність, терапевтичну активність [64].

Перспективною допоміжною речовиною у технології мазей, супозиторіїв, розчинів для ін'єкцій, очних лікарських плівок та інших лікарських форм є колаген. Передбачається, що лікарська речовина, потрапляючи в «петлі» молекул колагену, утворює сполуку – включення типу клатратів, забезпечуючи тим самим пролонговану дію. Допоміжні речовини повинні відповідати основним вимогам – розкрити всю гаму фармакологічних властивостей препарату, забезпечити оптимальну дію лікарської речовини.

Для оцінки поверхнево-активних властивостей дисперсій колагену визначали їхню здатність поєднуватися з різними жирами та порошкоподібними речовинами, нерозчинними у воді. Встановили, що диспергований колаген у концентрації вище 0,5% утворює стійкі емульсії типу «масло-вода» з риб'ячим жиром, персиковим, соняшниковим, обліпиховим, вазеліновими маслами. Емульсії, отримані механічним і ультразвуковим диспергуванням, не розшаровуються протягом року, мають в'язко-пластичні властивості, при невеликих зусиллях рівномірно розподіляються на поверхні шкіри і слизових оболонок. Високов'язкі дисперсії колагену є хорошими стабілізаторами та суспензійними системами. Вони добре поєднуються з гідрофільними (кістковий порошок) і гідрофобними (стрептоцид) речовинами, 1,6-2,5% дисперсії колагену здатні інкорпорувати до 600% (у перерахунку на сухий білок) кісткового борошна або стрептоциду. Суспензійна система, що утворюється, стійка протягом тривалого часу [13].

Внаслідок оборотності зв'язків колаген у комплексах при введенні в макроорганізм здатний піддаватися лізису, а можливість регулювання швидкості лізису застосуванням дублюючих речовин дозволяє створювати пролонговані лікарські препарати з різними термінами дії. На сьогодні найбільш вивчені комплекси колагену з багатьма речовинами. Наприклад, у комплексі колагену з гепарином встановлено, що пролонгований антикоагуляційний ефект пов'язаний із існуванням досить міцного колаген-гепаринового комплексу. Після розчинення в крові є агрегати-молекули гепарин-колагену, які функціонують досить активно доти, доки повністю не деградує білкова частина комплексу, після чого гепарин інактивується звичайним шляхом [13].

Важливе значення мають взаємодія колагену з антибіотиками. Колаген не тільки пролонгує дію антибіотиків, але в ряді випадків знижує їхню токсичність. Є також відомості про іммобілізацію ферментів на колагені. Так, описаний метод іммобілізації уреаз на порошках колагену, модифікованих

дезамінування, метилювання та сукцинуванням. В останні роки роботи ряду вчених були спрямовані на створення комплексів колагену з нейролептичними властивостями. У цій галузі заслуговує на увагу комплекс, створений на основі  $\beta$ -феніл- $\gamma$ -аміномасляної кислоти і колагену [59].

Як гель для пролонгованих лікарських препаратів частіше використовують розчини високомолекулярних сполук різної концентрації, що дозволяє регулювати час пролонгування. До таких речовин відносяться метилцелюлоза, карбоксиметилцелюлоза та натрій карбоксиметилцелюлоза (1%), полівінілпіролідон, колаген та інші високомолекулярні сполуки (приклад – очні краплі у вигляді 10% розчину сульфацил натрію, пролонговані 1% метилцелюлози) [66].

Була створена лікарська форма аміназину на колагені, що має пролонговану антистресову дію. Імобілізацію проводилася методом включення в гель, який дозволяє максимально зберегти нативність іммобілізованого з'єднання, що захищає його від впливу довкілля та мікроорганізмів. Препарат був отриманий шляхом введення сухого аміназину в продукти розчинення колагену, отримані з сухожилів великої рогатої худоби методом попередньої лужно-сольової обробки з подальшим розчиненням в оцтовій кислоті. Аміназин додавали з розрахунку 25 мг на 1 мг 1% колагенового гелю. Характер взаємодії колагену з аміназином визначали за допомогою диференційно-термічного аналізу. Встановлено, що термограма денатурації одержаного препарату до температури 37 °С переважно збігається з термограмою денатурації ПРК. Температура денатурації дорівнювала 34°C, тобто термостабільність колагену в препараті не змінювалася, що свідчить про відсутність досить міцних зв'язків його з аміназином при використанні зазначеного методу іммобілізації. Отримані результати підтвердилися при випробуваннях дії препарату *in vivo*. Порівняно з чистим аміназином отриманий препарат повільніше всмоктується і має значно меншу токсичність, що можна пояснити застосуванням як розчинник більш в'язкої речовини – колагену.

Колаген здатний до солюбілізації лікарських речовин, що мають у своєму складі амінокарбоксылні групи. Переваги основи полягають у тому, що вона повністю абсорбується та утилізується при введенні в організм, стимулює процеси регенерації пошкоджених тканин, має велику сорбційну та слабку антигенну здатність, не має токсичних та канцерогенних властивостей. У фармації використовують переважно 2-3%-ві (для очних мазей) гелі для лікування ран [76].

Все викладене дозволяє зробити висновок, що колаген за фізико-хімічними та біологічними властивостями може бути використаний як допоміжна речовина в технології різних лікарських форм.

#### **1.4.4.1 Дерматологічні і очні лікарські плівки на основі колагену**

Найчастіше колаген використовується у виробництві плівок, губок, волокнистих матеріалів.

Плівки з успіхом використовуються для лікування пролежнів, трофічних виразок нижніх кінцівок, скальпованих ран шкіри, "Штучна шкіра". Плівки одержують шляхом сушіння на повітрі тонкого шару розчинів колагену, що мають певне значення рН, як з лікарськими речовинами, так і без них. Для отримання плівок використовують 2% оцтовокислий розчин колагену. Розчин колагену в оцтовій кислоті одержують за наступною схемою. Колаген для більш швидкого розчинення подрібнюють у м'ясорубці, заливають 3% розчином оцтової кислоти і розчиняють при постійному перемішуванні до утворення концентрованого розчину, що є в'язкою гелеподібною масою (1 кг колагену розчиняють приблизно в 3 літрах 3 % оцтової кислоти). Застосування оцтової кислоти є доцільним тому, що вона є одним з кращих розчинників колагену, а її бактерицидні властивості в даній концентрації забезпечують тривале зберігання отриманих розчинів білка. Для видалення нерозчинних домішок та одночасної гомогенізації розчин колагену продавлюють через капронову тканину з отворами розміром 0,1-0,2 мм.

Оцтовокислий розчин колагену стандартизують за показниками:

1. Концентрація колагену (визначають по біуретової реакції), вона повинна знаходитися в межах 0,9-1,1%, оскільки найбільш зручна в технології плівок. Отриманий розчин легко розтікається поверхнею кювети, що дозволяє отримати плівки однакової товщини по всій площі;

2. Кислотність (визначають методом нейтралізації) має бути 0,1-0,15 н;

3. Відносна в'язкість має бути не менше 4.

При необхідності в розчин колагену додають дистильовану воду або оцтову кислоту для отримання заданої концентрації білка або кислотності розчину. Стандартний 1% розчин колагену використовують для введення лікарських речовин та отримання плівок. Для збільшення термінів розсмоктування на рані плівку дублять формаліном або іншими дубителями, а для надання еластичності як пластифікатор використовують гліцерин.

У 1975 р. співробітниками кафедри аптечної технології лікарських форм та відділу з вивчення та застосування колагену в медицині розроблено склад та технологію дерматологічної плівки з метилурацилом. З-поміж протизапальних засобів обрано метилурацил – похідну піримідину. Метилурацил поряд з ослабленням ексудативних та альтернативних проявів запального процесу прискорює регенерацію тканин, загоєння рай, опіків та ін.

Враховуючи високу ефективність лікування метилурацилом різноманітних ушкоджень шкіри та слизових оболонок, доцільно комбінування метилурацилу зі стимуляторами регенерації, що мають інший механізм дії, а саме з біополімером – колагеном.

*Технологія розчину колагену із метилурацилом* – розраховану кількість метилурацилу, змішують з мінімальним об'ємом води, вводять при постійному перемішуванні 1% розчин колагену.

У 1979 р. на кафедрі технології лікарських форм ім. І. М. Сеченова спільно зі співробітниками Тбіліського інституту удосконалення лікарів розроблено інтраокулярні плівки з гентаміцину сульфатом та очні плівки "Гентрикол", що містять гентаміцину сульфат та тримекаїн.



Необхідність у виготовленні очних плівок пролонгованої дії викликана тим, що є труднощі у проникненні значної частини лікарських речовин в око, обумовлена низкою причин таких як наявність гематофтальмічного бар'єру, складність у досягненні необхідної постійної концентрації в очному яблуці при введенні лікарського препарату у вигляді ін'єкцій чи перорально.

Інтраокулярна плівка вводиться в очне яблуко і розміщується у передбаченому планом операції місці при хірургічній обробці поранень переднього відділу ока, планових порожнинних операціях на очному яблуку, реконструктивно-відновлювальних операціях, хірургічному лікуванні ендoftальмітів.

Очні плівки "Гентрикол", що містять сульфат гентаміцину в комбінації з тримекаїном, призначені для покриття переднього відділу ока при поверхневій та проникаючій травмі рогівки, склери, опіках. Вони запобігають можливості вторинного інфікування при транспортуванні хворого до спеціалізованого травматологічного центру, а також можуть застосовуватися при захворюваннях рогівки різної етіології.

Плівки одержують методом вільного випаровування розчинника. У кювети з гідрофобною поверхнею виливають приготовлений розчин колагену із введеними лікарськими речовинами (товщина шару 5-7 мм) та залишають для висушування. Сушіння проводять при температурі 25-30 °С (до утворення плівок товщиною 0,04-0,05 мм з залишковою вологістю 10-15%). Сухі плівки знімають з поверхні кювет, розрізають, пакують у поліетиленові пакети і стерилізують опроміненням у дозі 25000 Гр [54].

#### **1.4.4.2 Мазі на основі колагену**

Колагенові основи у вигляді 3-5% гелів рекомендовані для мазей з речовинами, що мають ранозагоювальну дію, з анестетиками. З антисептиками: 3 % гелі мають оптимальні реологічні властивості, легко наносяться на шкіру; 5% гелі – більш щільні. В колагенові основи можна вводити до 3% стрептоциду, 3-5% борної кислоти та інші лікарські речовини.

При приготуванні основ мазей використовують диспергований порошок колагену, отриманий методом низькотемпературного подрібнення, в концентраціях від 2 до 5%. При вищій концентрації отримують щільну густу масу, яку доцільно застосовувати як основу свічок.

*Технологія основ мазей.* Порошок колагену насипають тонким шаром на поверхню дистильованої води (1/2 розрахованого об'єму) і залишають для набухання на 20-30 хв. Воду, що залишилася, додають частинами до набряклого колагену при постійному перемішуванні за допомогою електронної мішалки до утворення однорідного гелю. Масу залишають на добу до повного загусання.

Важливими є реологічні властивості, зокрема в'язкість. Від показника в'язкості залежить збереження однорідності розподілу лікарських речовин обсягом всієї маси мазі, отже, точність її дозування, зручність при нанесенні мазі на шкіру і слизові оболонки. Значний вплив має в'язкість та міцність основ для мазей на дифузію лікарських речовин у шкіру та слизові оболонки. Всмоктування йде швидше з м'яких мазей, що легко наносяться на шкіру, ніж з паст з високими показниками в'язкості і міцності.

В'язкість водних гелів колагену близька до в'язкості гідрофільних основ для мазей із використанням синтетичних полімерів. Низьке значення в'язкості 2-4% гелів колагену є передумовою високої швидкості та повної віддачі, включених до них лікарських речовин, що дозволяє без особливих зусиль та безболісно наносити мазі на шкіру та слизові оболонки [54].

#### **1.4.4.3 Колагенвмісні препарати у формі супозиторіїв**

З огляду на позитивну дію вітаміну U під час лікування деяких гінекологічних захворювань доцільно створення вагінальних лікарських форм метилметионинсульфонил хлориду. Вибір основи проводять з урахуванням спроможності колагену обмежено набухати у водних розчинах вітаміну U (оптимальна концентрація колагену 15%). Для запобігання

швидкому висиханню свічок та впливу мікроорганізмів вводять гліцерин (6%) та консервант (цетилпіридиній хлорид 0,01%).

*Технологія свічок.* Вітамін U, консервант і гліцерин розчиняють у розрахованій кількості очищеної води. Колаген насипають тонким шаром на поверхню водного розчину та залишають для набухання у ступці на 40-50 хв при постійному перемішуванні. Після цього масу залишають на 5-6 годин для подальшого набухання, потім ретельно перемішують до отримання білої однорідної пружної маси, з якої формують кульки і упаковують в поліетиленову плівку [54].

#### **1.4.5 Використання колагену у медичній галузі**

Використання колагену як лікувального матеріалу інтенсивно розробляється рядом лабораторій, науково-дослідних інститутів та ЗВО нашої країни. Насамперед слід відзначити його застосування як підкладки, захисного засобу, а також транспортера ліків.

Це – колагенові плівки для офтальмології, губки для покриття ран та опіків, капсули та таблетки з різними наповнювачами для перорального введення; колагенові гелі, їх комбінації з ліпосомами для регульованої подачі препаратів через шкіру; наночастинки/мікросфери для іммобілізації ферментів, похідні трансгенної інженерії, індуктори толерантності, що застосовуються при лікуванні ревматоїдного артрити; культуральні середовища.

Провідну роль колаген грає у тканинній інженерії як біоконструкційний матеріал, де він використовується для тимчасової заміни шкірної та кісткової тканини, як компонент у штучних кровоносних судинах та клапанах, імплантат у косметичній хірургії. Колагенові препарати знижують запальні реакції, активізують репаративні процеси та скорочують терміни загоєння ран, що підтверджується успішним застосуванням колагену у рановій та опіковій терапії. Губки та серветки на основі колагену, просочені антибіотиками, мають гарну сумісність зі шкірними тканинами завдяки низькій алергенності та біодеструкції колагену. Наприклад, найкращі результати хірургічного лікування

були отримані, коли в якості передопераційної підготовки застосовувалася автосироватка, а під час операції колагенові губки з лікарськими добавками. Слід зазначити, що у всіх матеріалах колаген має впорядковану структуру. Така структура важлива для стимулювання активності моноцитів, тромбоцитів та взаємодії їх із клітинами.

Денатурований колаген на порядок менш активний. Колаген та його гідролізати часто входять до рецептур різноманітних кремів та еліксирів як вологоутримуючі та поживні компоненти. Ефективність таких косметичних засобів пояснюється тим, що гігроскопічна колагенова плівка діє на зразок вологого компресу. Отже, знижується трансепідермальна втрата води шкірою. Завдяки гігроскопічній властивості колагену підвищується вологість рогового шару шкіри, що дає підстави вважати косметичний крем або еліксир з колагеном надійним захисним засобом, а, отже, геронтопротектором [72].

Препарати, до складу яких входить колаген, допомагають зміцнити кістки та зробити суглоби рухливими. Подібні засоби необхідні за підвищених фізичних навантажень. Колаген та еластин роблять зв'язки, м'язи та сухожилля більш міцними та еластичними. Завдяки достатній кількості протеїнів ймовірність швидкого стоншення хрящової тканини зводиться до мінімуму.

Колаген для суглобів, кісток, зв'язок, хрящів вживається в різних формах (пігулках, порошку, продуктах харчування). Для посилення ефекту від прийому колагену для суглобів часто фахівці призначають додаткові засоби (аскорбінову кислоту, глюкозамін сульфат і т. д.), які необхідні для швидкого засвоєння білка.

Коли колаген входить до складу ліків, що призначаються при лікуванні ран у вигляді раневого покриву, через високу осмотичну активність він має зневоднювальну дію на тканини у вогнищі запалення, що сприяє подовженню дії активних речовин ліків. Застосування колагену для закриття

раневої поверхні при лікуванні пацієнтів з обширними опіками, як основи своєрідної штучної шкіри, може значно знизити ризик інфікування [32].

Ще у 2007 році були проведені перші успішні клінічні випробування трансплантації шкіри, штучно вирощеної з людських шкірних фібробластів на матриці колагену людини. Результати цього першого дослідження показали, що штучні трансплантати забезпечують безперервне закриття рани без рубців та контрактур, і не викликають серйозних побічних ефектів [2].

В даний час існує багато клінічних випробувань штучних пористих каркасів на основі колагену та еластину, призначених для відновлення різних м'яких тканин. Результати цих досліджень показують, що вже через 7 днів після імплантації каркасу власні клітини реципієнта виробляють позаклітинний матрикс (зокрема, фібробласти, що виробляють колаген типу I), і починається васкуляризація новоутвореної тканини. Одночасно деградують компоненти імплантованого каркасу: колаген – за 15 та еластин – за 90 днів [2].

Особливої уваги заслуговують біологічно активні пептиди – похідні колагену, які мають протипухлинну дію. Наприклад, фрагмент колагену IV типу, характерний для базальної мембрани, здатний пригнічувати патологічний ангіогенез та ріст пухлини [45]. В даний час розвивається нова галузь молекулярної біології, завданням якої є створення синтетичних пептидів на основі біологічно активних пептидів колагену та інших білків позаклітинного матриксу.

Впровадження технологій виробництва людського рекомбінантного колагену з використанням біореакторів на основі культур клітин ссавців, комах, дріжджів, а також із застосуванням трансгенних систем виробництва, таких як молочні залози мишей та корів, лялечки шовкопряда, культури клітин та рослини тютюну дуже перспективні. За допомогою рекомбінантної технології можна отримати колаген з потрібною спіраллю, що має таку ж амінокислотну послідовність, що й колаген, отриманий з тканин людини. Слід зазначити, що тільки клітини ссавців, трансфіковані генами колагену,

виробляють повнорозмірний гідроксильований колаген. При використанні інших систем пролін у виробленому ними колагені не гідроксильовався або недостатньо гідроксильовався. В результаті самозбирання колагенових фібрил такий колаген був нестабільним і сприйнятливим до протеолітичної деградації, що зробило його непридатним для багатьох застосувань в тканинній інженерії [44].

Що стосується використання в медицині та косметології людського колагену, отриманого з тканин трупів, абортивного матеріалу та плаценти, то використання перших двох джерел обмежено через моральні, етичні та правові причини. Більш-менш широко в медицині використовується децелюляризований міжклітинний матрикс, отриманий з кісток та шкіри трупів, основною речовиною якого є колаген. Останнім часом все більше уваги приділяється розробці методів екстракції та використанню плацентарного колагену. Не тільки людська плацента використовується як джерело колагену, а й плацента великої рогатої худоби [65].

## Висновки до розділу 1

У даному розділі розглянуто особливості будови та властивостей колагену. Наведено класифікацію за типами та джерелами отримання. Приділено увагу значенню колагену для організму людини, особливостям його синтезу в організмі. Визначено перспективи застосування колагену та препаратів на його основі у різних галузях промисловості.

Потенціал використання колагену визначається ступенем прояву таких його властивостей, як стійкість до гідролізу, схильність до гідратації, розчинність та здатність до самостійного збирання його структурних одиниць. Усі ці властивості залежать як від джерела сировини, так і від різних фізико-хімічних факторів, що впливають на колаген у процесі його отримання. Основними такими фізико-хімічними факторами є температура, рН та склад середовища при вилученні.

У харчовій промисловості використання колагену обмежене його низькою білковою харчовою цінністю.

Колаген та його гідролізати часто входять до рецептур різноманітних кремів, шампунів, бальзамів, кондиціонерів, еліксирів, масок, у тому числі тканинних, колагенових листів тощо як вологоутримуючі та поживні компоненти.

Унікальна молекулярна структура колагену, наявність на його поверхні великої кількості активних функціональних угруповань дозволяють використовувати його як матрицю для іммобілізації різних біологічно активних та лікарських речовин. Перевага колагену перед синтетичними полімерами, які застосовуються з цією метою, полягає в тому, що він повністю утилізується організмом.

У медицині колаген знайшов застосування у тканинній інженерії, у складі комплексних препаратів для лікування раневих поверхонь, при використанні рекомбінантного колагену, як препарат для зміцнення кісток та суглобів.

## РОЗДІЛ 2 ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

### 2.1 Характеристика цільового продукту

Колаген є основним білком сполучної тканини, шкіри, сухожиль, хрящів, зв'язок, рогівки, зубів, нігтів та волосся [13]. Колаген є групою різноманітних молекул позаклітинного матриксу, потрійно-спірального домену як загального структурного елемента [5].

Будова колагену має характерну особливість – правосторонню потрійну спіраль, що складається з  $\alpha$ -ланцюгів (рис. 2.1). Потрійна спіраль колагену типу 1 може бути утворена двома або трьома різними ланцюгами (гетеротримери) [36]. Кожен з трьох колагенових  $\alpha$ -ланцюгів згортається в лівосторонню спіраль, яка збирається в канатоподібну фігуру, облямовану С- та N-пропептидами.

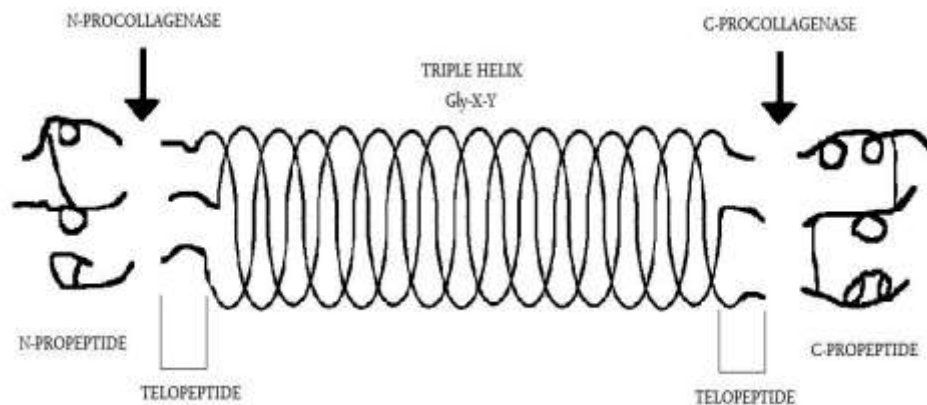


Рис. 2.1. Молекулярна структура фібрилярних колагенів

Колаген складається з амінокислот: гліцину (близько 33% амінокислотних залишків); проліну (12-14%); 4-гідроксипроліну (<14%); 4-гідроксилізіну (1,5%) [34]. У складі наявні триптофан і цистеїн.

Колаген має загальну структуру, що повторюється  $Gly-X-Y$ , в якій позиції  $X$  і  $Y$  часто займають залишки проліну ( $Pro$ ) і 4-гідроксипроліну ( $Hyp$ ) [3].

Найбільш поширеною є повторювана послідовність  $Gly-X-Y$ , на відстані 700 Å, що призводить до утворення потрійних спіральних доменів завдовжки 300 нм, що відповідає приблизно 1000 амінокислотним залишкам.



Сировиною для отримання колагену типу 1 обрано відходи шкіряної промисловості, а саме зелену голину обрізь ПрАТ «Чинбар» (м. Київ), показники хімічного аналізу якої, наведено у табл. 2.1. Вивчення можливості екстрагування колагену з даного виду сировини методом кислотного гідролізу проводиться на кафедрі біотехнології, шкіри та хутра Київського національного університету технологій та дизайну. Метою даної роботи було розробити технологічну схему отримання колагену типу 1 методом ферментативного гідролізу колагенвмісних відходів шкіряного виробництва [31].

Таблиця 1.

### Хімічний аналіз зеленої голиної обрізі

№	Показник	Масова частка, %
1	- вологи	82,1
2	- мінеральних речовин*	10,7
3	- загального азоту*	14,3
4	- гідроксиду кальцію*	2,6

Примітка: \* на абсолютно суху речовину

Головною вимогою до цільового продукту є збереження спіральної структури і, як наслідок, збереження цінних біологічно активних властивостей.

Планується випуск сухого препарату колагену як компоненту косметичної продукції. Властивості готового продукту повинні відповідати вимогам ДСТУ 4766:2007 «Маски косметичні». Косметичні маски – це суміш натуральних та синтетичних складників у вигляді крему, гелю, пасти чи порошку із вмістом функціональних добавок рослинного або мінерального походження відповідно до призначеності (зволоження, підсушування, знежирювання, тонізування, вибілювання, заживлювання, пом'якшування, очищування, ліфтингу тощо).

За вимогами державного стандарту сухі маски повинні відповідати певним вимогам:

1. Зовнішній вигляд – днорідна порошкоподібна маса без сторонніх домішок.

2. Колір – властивий кольору, встановленому у технічних вимогах на косме-тичну маску певної назви.

3. Масова частка води та летких речовин, не більше ніж 10 %.

Вимоги до мікробіологічних показників препарату наведені у табл.2.2.

Таблиця 2.2

### Мікробіологічні показники косметичних масок

№	Назва показника	Характеристика і норми
1	Кількість мезофільних аеробних і факультативно- анаеробних мікроорганізмів, КУО/г (см <sup>3</sup> ), не більше ніж	1000
2	Бактерії <i>Enterobactereaceae</i> в 1 г (см <sup>3</sup> )	Немає
3	<i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г (см <sup>3</sup> )	Немає
4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г (см <sup>3</sup> )	Немає
5	Кількість дріжджів та пліснявих грибів, КУО/г (см <sup>3</sup> ), не більше ніж	100

## 2.2 Характеристика біологічного агента

Рід *Bacillus* налічує близько 217 видів і об'єднує численну групу аеробних або факультативно анаеробних грампозитивних мікроорганізмів паличкоподібної форми.

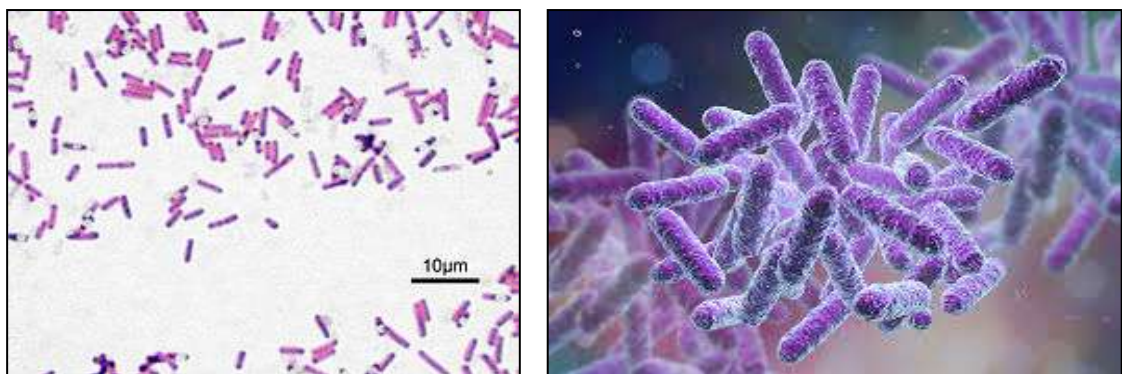


Рис. 2.2. Мікрофотографія та модель *Bacillus subtilis*

Бактерії роду *Bacillus* характеризуються стійкістю до несприятливих умов зовнішнього середовища, в тому числі й у шлунково-кишковому тракті, тому мають перевагу перед мікроорганізмами інших таксономічних груп при використанні їх у біотехнології та медицині. Вони є одними з домінуючих

видів мікроорганізмів на Землі. У процесі еволюційного розвитку людства бацили вступали в симбіотичні відносини з організмом людини й інших ссавців і є важливими компонентами їхньої екзогенної мікрофлори, а також виконують комплекс корисних для макроорганізму функцій, найважливішою з яких є здатність запобігати колонізації кишечника патогенами [11, 67].

*Bacillus subtilis* або сінна паличка – вид грамполозитивних спороутворюючих аеробних бактерій, представників роду бацили (*Bacillus*). *Bacillus subtilis* – один із найбільш добре вивчених мікроорганізмів. *Bacillus subtilis* має вигляд безбарвної прямої палички, розміром приблизно 0,7 мкм завтовшки і 2-8 мкм завдовжки. *Bacillus subtilis* може розмножуватися поділом. Іноді окремі *Bacillus subtilis* після поперечного поділу залишаються з'єднаними в нитки.

*Bacillus subtilis*, завдяки продукованим антибіотикам і здатності закислювати місце існування, є антагоністом патогенних й умовно-патогенних мікроорганізмів, таких як сальмонела, протей, стафілококи, стрептококи, дріжджові грибки. Ці мікроорганізми продукують ферменти, що видаляють продукти гнильного розпаду тканин; синтезують амінокислоти, вітаміни та імуноактивні фактори. Деякі штами є продуцентами гіалуронової кислоти [50, 17].

Саме завдяки здатності утворювати протеази *Bacillus subtilis* було обрано в якості біологічного агента в цій роботі.

У роботі передбачено використання промислового штаму *Bacillus subtilis* 3Н (Державна колекція патогенних мікроорганізмів, Росія (ДКПМ), № 248). *Bacillus subtilis* 3Н це грамполозитивні аеробні спороутворюючі палички, розміром 1,5-4,0x0,4-0,6 мкм, розташовані поодинокі або у вигляді ланцюжків. Клітини рухливі, утворюють спори овальної форми, які розташовуються у клітині центрально. При спороутворенні клітини не роздуваються. Безпечність штаму та його фізіолого-біохімічні властивості наведено у табл. 2.3-2.4 [62].

Таблиця 2.3.

**Фізіолого-біохімічні властивості промислового штаму *B. subtilis* 3H**

№	Властивості	Тестування*
1	Ферментація	
	- глюкози	+
	- арабінози	+
	- ксилози	+
	- маніту	+
2	Утворення кислоти та газу з глюкози	–
3	Утворення кислоти з глюкози	+
4	Утилізація	
	- цитрату	+
	- пропіонату	–
5	Гідроліз	
	- крахмалю	+
	- сечовини	–
	- казеїну	+
	- тирозину	–
6	Редукція нітратів	+
7	Утворення газу з NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> в анаеробних умовах	–
8	Знебарвлення метиленового синього	+
9	Каталаза	+
10	Реакція Фогес-Проскауера	+
11	Аргініндегідролаза	+
12	Лецитиназа	–
13	Гіалуронідаза	–
14	Гемолітична активність	–
15	Утворення глобул полі-β-ксімасляної кислоти на глюкозному агарі	–
16	Лізоцимна активність	–
17	Ріст при 50 °С	+
18	Ріст при 65 °С	–
19	Ріст в 7% NaCl	+
20	Стійкість до дії шлункового соку	+
21	Стійкість до дії жовчі	+
22	Адгезивна активність	–
23	Антагоністична активність (зони затримки росту тест-штамів у мм на агаризованому середовищі Гаузе 2)	не менше 10-15

\* Примітка: "+" позитивний тест; "–" негативний тест

Таблиця 2.4.

**Вивчення безпечності штаму *B. subtilis* 3H**

Нешкідливість		Вірулентність		Токсичність		Токсигенність	
Доза 10 <sup>10</sup> КУО/ 0,5 мл)	Кількість живих/ загиблих мишей	Доза 10 <sup>9</sup> КУО/ 0,5 мл)	Кількість живих/ загиблих мишей	Доза 10 <sup>9</sup> КУО /мл	Кількість живих/ загиблих мишей	Доза (мл)	Кількість живих/ загиблих мишей
0,1	10/0	0,5	10/0	0,5	10/0	0,5	10/0
1	10/0	1	10/0	1,0	10/0	1,0	10/0
10	10/0	10	10/0	2,0	10/0		

*B. subtilis* 3H не росте в анаеробних умовах. На живильному середовищі Гаузе № 2 або напівсинтетичному середовищі з дріжджовим діалізатом після інкубації при температурі 37±1 °С протягом 24 год утворює шорсткі рожево-бежеві або коричневі колонії з фестончастими краями, легко знімаються петлею з агаризованого середовища (допустима наявність до 20% гладких білих або прозорих колоній). На м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) утворює білу плівку і слабкий придонний осад, викликаючи незначне помутніння середовища. Є продуцентом ферментів амілази та протеази.

Промислове виробництво засноване на вирощуванні/культивуванні виробничого штаму (або штамів) бактерій роду *Bacillus* на оптимальному поживному середовищі у відповідних умовах, методом поверхневого або глибинного культивування з можливою подальшою ліофілізацією отриманої біомаси в захисному середовищі.

### 2.3 Обґрунтування способу отримання колагену

Розчиненню білків передують гідратація та набування його молекул. Ступінь набування молекул білка збільшується при їх взаємодії з кислотами та лугами. Колаген має здатність реагувати як з кислотами, так і з лугами. Вплив на швидкість та ступінь гідратації колагену залежить від концентрації та сили електроліту, який використовується при екстрагуванні. Встановлено, що збільшення концентрації кислоти або лугу посилює набування колагену

та прискорює його розчинення. Під впливом сильної кислоти молекулярні ланцюги деформуються внаслідок електростатичного відштовхування, що призводить до потовщення та скорочення колагенових волокон [4]. Після цього відбувається поступовий розрив внутрішньомолекулярних водневих зв'язків і руйнування структури на основі водневих містків. Зрештою, цей ефект призводить до зниження температури денатурації колагену.

При обробці кислотою набухання та подальше розчинення колагену відбувається в результаті поєднаної дії осмотичних та електростатичних сил. Було показано, що в концентрованих кислотних розчинах переважає молекулярна адсорбція з колагеном (переважно пептидними зв'язками), а в розведених кислотних розчинах – процеси йонної сорбції. Слабодисоційовані органічні кислоти (наприклад, оцтова кислота) сорбуються або у формі йонів, або у нейонізованій формі. Вони не повністю пригнічують йонізацію основних білкових груп, тому для руйнування колагенової структури потрібні високі концентрації таких кислот і більш тривалий вплив. Але навіть за цих умов колагенове волокно повністю не розчиняється [25].

В результаті обробки кислотою білки набувають позитивних зарядів і утворюють солі з аніонами доданої кислоти. При додаванні сильної основи заряд білкових молекул стає негативним, а їх карбоксильні групи в йонізованому стані утворюють солі з додаванням лужного катіону.

Колаген також можна модифікувати обробкою сольовими розчинами. Напрямок та ступінь цих змін залежать від концентрації, типу та сили аніонів і катіонів, а також від їх спорідненості до білка колагену. Відмінності у складі солей ізолюючого середовища найбільше відображаються у гідратації колагену та набуханні. Наприклад, аніони йоду та хлорату, катіони кальцію та магнію збільшують набухання колагену. Хлорид натрію здатний роз'єднувати гідрофобні та водневі зв'язки та змінювати структуру води у безпосередній близькості від місць зв'язування, що порушує стабілізацію колагенових гелів. Було показано, що колаген, отриманий з різних джерел (різних типів тварин, тканин), відрізняється за ступенем сприйнятливості до

впливу кислотності, складу солей та концентрації ізолюючого середовища. Таким чином, колаген, вилучений з кісткової тканини, є більш стійким до хлориду натрію у концентрації 4-6 %, ніж колаген, вилучений зі шкіри. Рибний колаген менш стійкий, ніж колаген ссавців, через низький рівень імінокислот (пролін та гідроксипролін) [7].

Крім хімічного гідролізу, колаген можна вилучити з більшості джерел шляхом обробки сировини ферментами. Хімічний гідроліз, як правило, використовується в харчовій промисловості, а ферментативний гідроліз або його поєднання з м'яким хімічним гідролізом більш підходить для отримання речовин з колагену, придатних для біомедичних цілей. Ферментативний гідроліз дозволяє зберегти отримані фрагменти колагену в їхній природній молекулярній формі [33]. Хоча колаген, отриманий такими методами, є більш безпечним та сумісним з тканинами і клітинами людини, процес його отримання набагато складніший і дорожчий, ніж хімічний гідроліз. Дослідницькі зусилля спрямовані як на пошук нових джерел колагену, так і на розробку нових ефективних та економічно ефективних методів його виділення.

Ферментативний спосіб отримання білкових гідролізатів відходів є перспективним через специфічність каталізаторів і вихідної сировини, що вимагають індивідуального підбору умов проведення реакції [41].

Схема технології ферментативного гідролізу [22]:

1. Приймання та зберігання сировини до оброблення.
2. Нагрівання сировини.
3. Подрібнення сировини.
4. Завантаження сировини в реактор.
5. Ферментативний гідроліз.
6. Центрифугування.
7. Видалення жиру.
8. Фільтрація.

Особливу увагу потрібно приділяти відповідності значення рН, та температури, найменші їх відхилення можуть понизити біохімічну активність

ферментів. Зміна рН середовища може привести до зміни характеру його дії, а підвищення температури до його інактивації та руйнування. Даний спосіб дозволяє отримувати готовий продукт з складом амінокислот, ідентичним амінокислотному складу вихідної сировини, і забезпечується умовами  $t^0=35\div 50$  °С, рН 7, тиск атмосферний. До переваг також належить і те, що руйнується структурний зв'язок білка з жиром, що дозволяє легко відокремити останній, і полегшує процес сушіння [22].

Ферментативний гідроліз є найкращим способом для збереження біологічної цінності колагену. Він поширений в харчовій та фармацевтичній промисловості, оскільки продукти отримані таким способом не містять залишкових органічних розчинників та токсичних хімікатів.

В процесі ферментації пептиди вивільняються під дією як мікроорганізмів, так і ендогенних протеолітичних ферментів. Результат процесу залежить від: підготовки субстрату; вибору ферменту; ступеня ферментативного гідролізу; гомогенізації; нагрівання для інактивації ендогенних ферментів; гідролізу; припинення ферментативної реакції [41].

#### **2.4 Обґрунтування способу виділення та очищення**

Для створення великої робочої поверхні і скорочення часу виділення матеріалу використовують дроблення сировини [23]. Холодна регенерація масла може застосовуватися пред процесом ферментації для виділення системи масло/жир [24]. Проводиться безперервний контроль параметрів роботи ферментера, також для підтримки стабільних умов ферментації використовують різні добавки [22]. По закінченню експонентної фази росту бактеріальної культури, біомасу піддають ультрафільтрації для відділення ферменту та переміщують його в основний реактор, при цьому додають воду з встановленим значенням рН, та температури, яка забезпечує процес ферментації. Через мембрани (принцип осмосу) проникають молекули розміром менше 10000 дальтон [41]. В результаті концентрації, утворюється дистильована вода, як побічний продукт, і її частина повертається на фільтр.



При невідповідності значення рН в гідролізат додають кісткове борошно, кальцій і азот. Процес проходить у безперервному або періодичному режимі в залежності від вмісту жиру в сировині.

Наступна стадія концентрація гідролізату фільтрату. Вона забезпечує видалення води перед проведенням процесу сушіння. Після концентрації продукт передається на стадію сушіння. Сушіння продукту проводять до стану порошку в розпилювальній сушарці, з використанням стадії охолодження. Після сушіння проводять грануляцію. Гранулят «конструюється» в стані інтенсивного руху з використанням засобів механічного псевдорозжиження [41]. Утворення грануляту відбувається в результаті розпилення концентрату на отриману масу. Всі операції проводяться в безперервному процесі.

Видалення твердих частинок проводять методом просіювання. Видалення з гідролізату твердих частинок і негідролізованих білків частинки розміром більше 1 мм, які можуть повертатися на стадію ферментативного гідролізу, проводиться безперервно або періодично за допомогою ситової фільтраційної системи. Проводиться центрифугування гідролізату. Після центрифугування потік, що включає тверді частинки, передається на процес флотації, де можуть відділятися відповідно до їх щільності на флотаційному резервуарі для розділення білків і гідроксиапатиту. Білки спливають і можуть механічно або вручну зніматися. Більш важкий матеріал опускається вниз.

Декантацію гідролізату проводять з метою очищення пептидного гідролізату від жиру, що забезпечить якість продукту. Дана операція проводиться з використанням такого обладнання: деканційна центрифуга; сепараційний пристрій для відділення масла; мембранний фільтраційний модуль. Відстійник декантатор може використовуватися в даній системі до масляного сепаратора і мембранного фільтру. Відстійник призначений для відділення твердих частинок зі щільністю більшою за густину рідини. Матеріал може спливати відповідно до тих же принципів, що

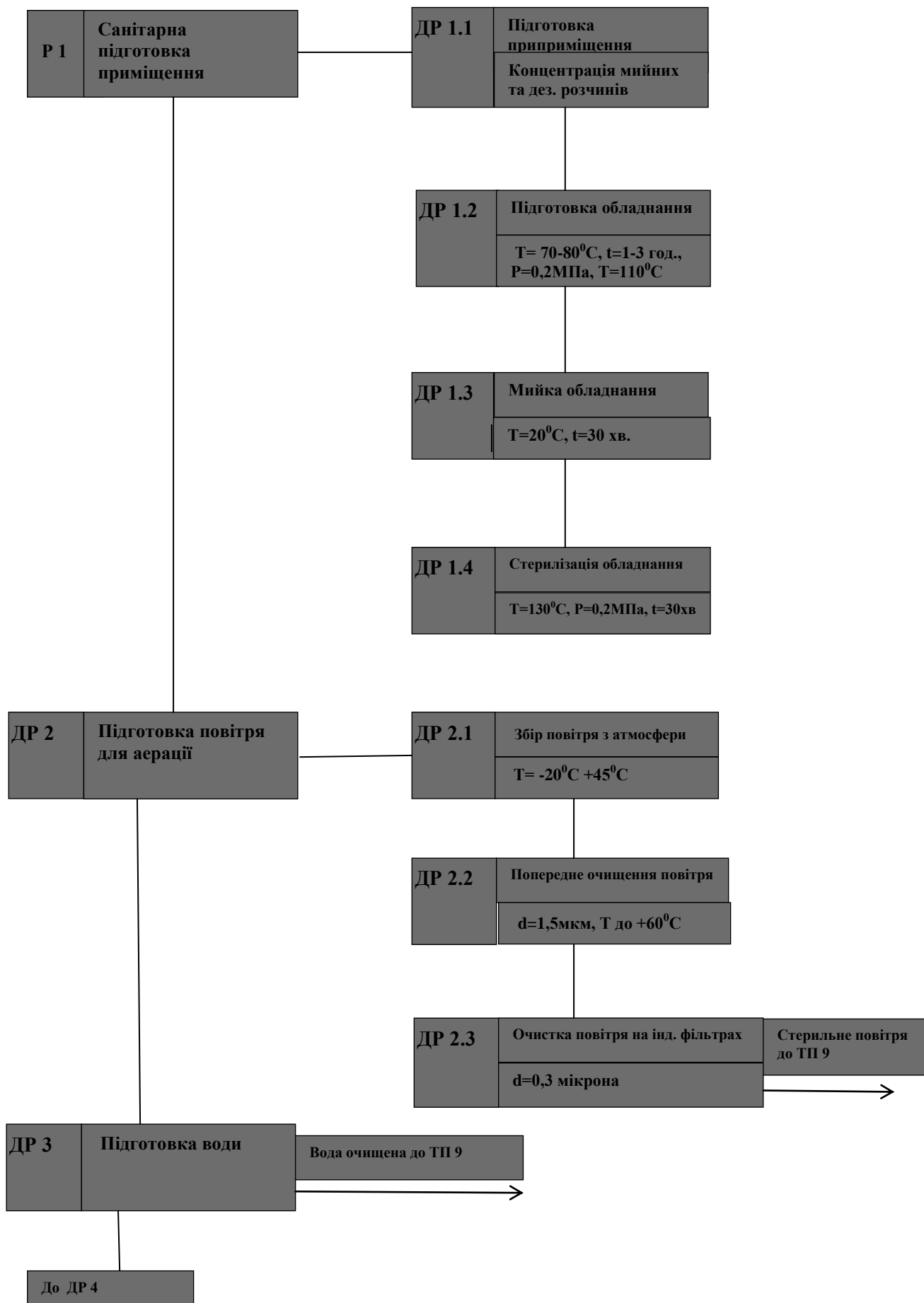
використовуються в фільтраційній системі. Відстійник декантатор не використовується якщо ситовий пристрій забезпечує бажану сепарацію.

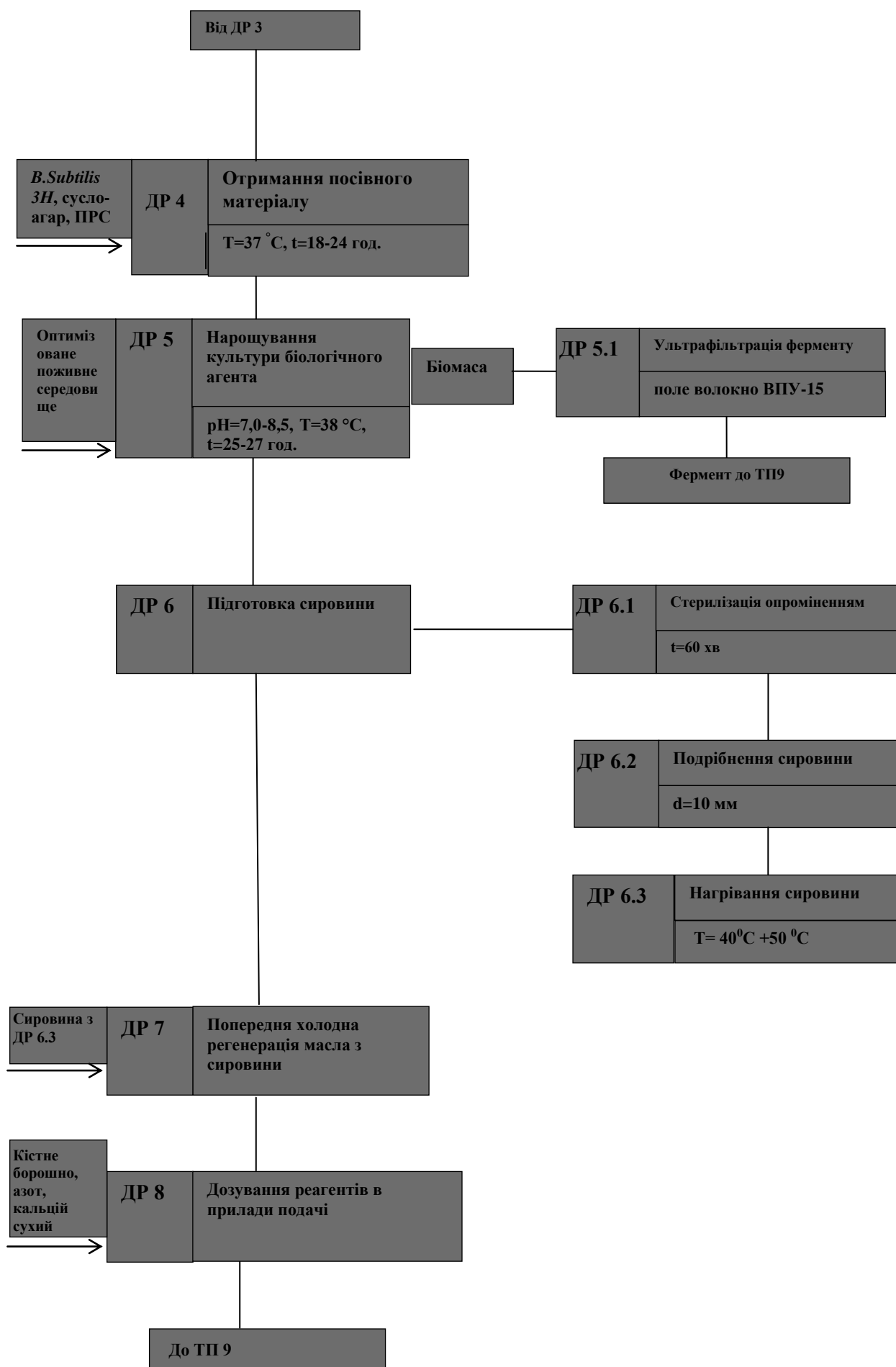
Поділ гідролізату на фракції це відділення гідролізату від жирової фракції. Пептидний гідролізат відділяють за допомогою трифазного сепаратора.

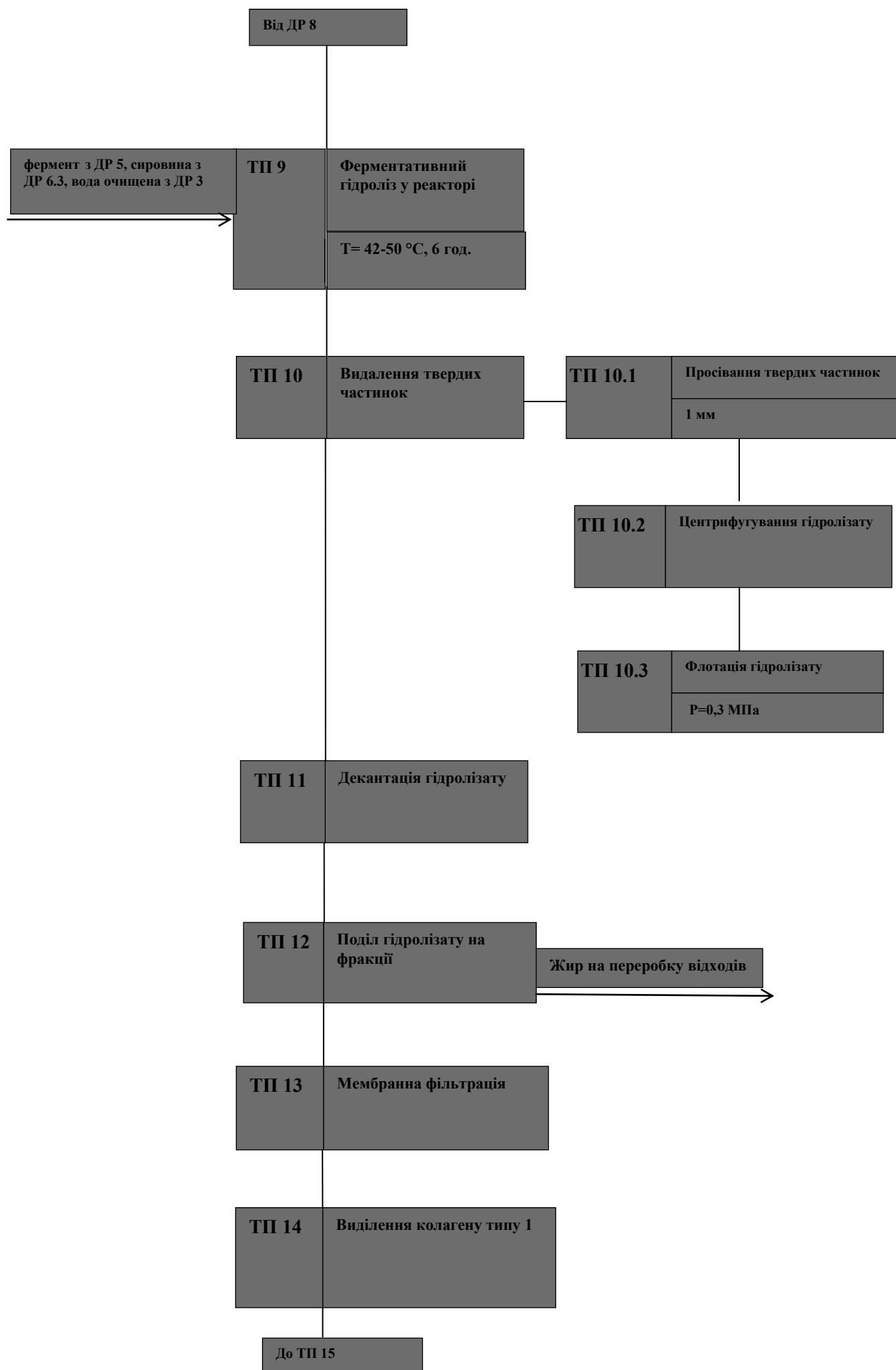
Мембранна фільтрація застосовується для очищення пептидного гідролізату й отримання якісного продукту. Відбувається перекачування гідролізату через мембранний фільтр, через мембрану проникають лише молекули пептидів певного розміру.

При фільтрації гідролізат прокачується через велику кількість трубчастих мембран або плоских мембран. Транспорт через мембрани базується на принципах осмосу. В результаті концентрації нефільтрованих вільних амінокислот і пептидів в якості побічного продукту утворюється дистильована вода, і її частина повертається на фільтр, також відбувається повернення порцій гідролізату, що не проникає через мембранний фільтр. Завдяки нижчій концентрації амінокислот і пептидів з одного боку мембран, під дією сил осмосу, відбувається фільтрація. Потік гідролізату уздовж поверхні мембрани механічно очищає її від осаду білкових залишків. Отриманий гідролізований фільтрат передають на стадію концентрації, для видалення води перед проведенням процесу сушіння. Досягається бажаний для рідкого продукту рівень концентрації амінокислот і пептидів. Бажано проводити процес дистиляції типу вакуумного випаровування. Даний етап забезпечує відокремлення бажаних пептидів і амінокислот з рідини, після і мембранної фільтрації. Оптимальний результат забезпечить апарат з природною циркуляцією та виносною гріючою камерою [54, 20]. Перевагами такого обладнання є: дана конструкція легко монтується; можна видаляти механічним способом; легкий доступ до внутрішньої поверхні гріючих труб; забезпечується висока швидкість процесу при пониженому тиску який складає 0,045 Мпа, до концентрації 38-40 %; оптимальний температурний режим 65-70°C.

## 2.5 Поетапно наведена блок-схема досліджуваної технології









## **2.6 Опис технологічної схеми отримання порошкоподібного препарату колагену**

### *ДР 1. Санітарна підготовка виробництва*

#### *ДР 1.1. Підготовка приміщення*

Санітарна підготовка приміщень до технологічного процесу проводиться відповідно стандартних операційних процедур, інструкцій і регламентів.

Мийні, дезінфікуючі розчини готує блок стерилізації.

#### *ДР 1.2. Підготовка обладнання*

Очищення обладнання перед технологічним процесом включає в себе оброблення миючими засобами при температурі 70-80 °С тривалістю 1-3 години. Потім оброблення розчином гідроксиду натрію, гострою парою  $t=110$  °С,  $P=0,2$  МПа, водою питною, тетрахлорметаном рідким. Відпрацьовані рідини підлягають утилізації.

#### *ДР 1.3. Мийка обладнання*

Очистку ферментера проводять розчином каустигідроксиду натрію після кожного культивування. У реактор поміщають каустичну соду, заповнюють водою до необхідного рівня. Розчин каустичної соди перемішують барботажем повітрям упродовж 30 хв, за температури 20°С. Відпрацьовані рідини підлягають утилізації.

#### *ДР 1.4. Стерилізація обладнання*

Стерилізація обладнання проводиться гострою парою при температурі 130 °С, тиску 0,2 МПа, протягом 30 хв, КУО<2.

### *ДР 2. Підготовка повітря для аерації*

Застосування системи перемішування забезпечує рівномірний розподіл живильних середовищ у ферментері. Перемішування забезпечується перекачуванням суспензії з високою швидкістю, з використанням барботажного повітря. Барботажене повітря попередньо очищається, що запобігає контамінації.

#### *ДР 2.1. Збір повітря з атмосфери*

Процес збору повітря відбувається за допомогою виносних труб, на висоті 4-6 м вище рівня землі при температурах від  $-20^{\circ}\text{C}$  до  $45^{\circ}\text{C}$ . Після збору повітря подається на фільтри.

#### *ДР 2.2. Попереднє очищення повітря*

Очищення повітря проводиться з використанням волокнистого фільтру, який затримує механічні часточки та пил. Фільтрувальним матеріалом даного фільтру є тканина Петрянова, з максимальним діаметром часток, що затримують частинки розміром 1,5 мкм, максимальна температура роботи фільтрів  $+60^{\circ}\text{C}$ . Ефективність очищення при застосуванні фільтра становить 98%. Частинки які затрималися на фільтри підлягають утилізації. Повітря поступає на доочищення на HEPA фільтри.

#### *ДР 2.3. Очищення на індивідуальних фільтрах*

Остаточне очищення повітря відбувається за допомогою фільтра HEPA, який встановлено у фільтр Канал-ФПК типу F5, що забезпечує тонке очищення повітря. Ефективність фільтру 99,97%. Фільтр дозволяє проводити очищення від частинок діаметром до 0,3 мікрон.

#### *ДР 3. Підготовка води*

Початкове очищення води залежить від системи водопостачання. Вода може відрізнитися за вмістом неорганічних, органічних речовин, жорсткістю, солоністю, складом та концентрацією мікроорганізмів. Вміст солей карбонатів та фосфатів може призвести до осадження живильних елементів таких як залізо ферум, купрум, молібден, що може спричинити негативний вплив на швидкість росту культури. Оптимальним рішенням таких проблем є використання води з артезіанських свердловин глибиною від 90 м.

Для очищення води використовується установка зворотного осмосу. Даним методом проводиться видалення органічних та неорганічних забрудників, мікроорганізмів та солей. Отримана вода підлягає технічному, хімічному та мікробіологічному контролю. Після контролю отриманої води, який підтверджує відповідність вимогам якості, очищена вода поступає у ферментер.



#### ДР 4. Отримання посівного матеріалу

Для отримання якісного продукту у відповідній кількості необхідно забезпечити процес культивування з достатньою кількістю якісної виробничої культури. Для вилучення колагену типу 1 передбачено використання протеази, яка є продуцентом життєдіяльності *B. subtilis* 3H.

На першому етапі для розмноження посівного матеріалу використовують агаризоване середовище. Другий етап проводиться методом пересіву посівного матеріалу на рідке поживне середовище.

В процесі отримання посівного матеріалу та по його завершенню проводиться мікробіологічний контроль культури.

#### ДР 5. Нарощування культури біологічного агента [77]

Для нарощування культури біологічного агента використовують ферментер, у якому безпосередньо готують поживне середовище. Склад поживного середовища:

- калій фосфорнокислий двозаміщений 3-водний – 0,3;
- амоній сірчаноокислий – 2,0;
- лимоннокислий натрій 5,5-водний – 2,0;
- мідь сірчаноокисла 5-водна – 0,005;
- цинк сірчаноокислий 7-водний – 0,004;
- залізо (II) сірчаноокисле 7-водне – 0,0005;
- кальцій хлористий – 0,165;
- марганець (II) сірчаноокислий 5-водний – 0,05;
- магній сірчаноокислий 7-водний – 0,3;
- d-мальтоза для бактеріологічних цілей – 5,0;
- рН середовища  $7,0 \pm 0,2$ .

В якості органічного джерела азоту в оживильному середовищі застосовують сечовину в кінцевій концентрації 0,5% та 150 мл/л середовища рідкого дріжджового екстракту.

Засівання поживного середовища проводять попередньо за 10-12 годин замоченою у цьому середовищі культурою, з розрахунку 0,75 г культури на

1м<sup>3</sup> середовища. Ліофільно висушену культуру штаму *Bacillus subtilis* 3H пересівають в рідке живильне середовище й інкубують по 18-24 годин при 37 °С. Культурою доругого пасажу засівають у ферментер й інкубують при температурі 37 °С при постійному перемішуванні та оксигенації.

Оптимальні параметрів процесу культивування: інокуляція реактора посівної культурою протеолітично активного клону доругого пасажу з посівною дозою 0,036±0,007 млрд. кл/мл, подача повітря під тиском 0,2 МПа. За цих умов за 25,0±1,2 год вирощування отримують концентрацію біомаси, що дорівнює 15,4±1,4 млрд. кл/мл, що забезпечує протеолітичну активність 15,9±1,9ПЕ/мл.

В процесі контролюється повітряний режим в ферментері та рН в межах [8]. По закінченню нарощування культури біологічного агента біомаса поступає на стадію ультрафільтрації.

#### *ДР 5.1 Ультрафільтрація ферменту [77]*

Для виділення ферменту використовують безклітинні культуральні рідини, отримані в процесі періодичного глибокого гомогенного культивування штаму-продуцента *Bacillus subtilis* 3H у ферментері.

При очищенні ферментвмісної біомаси отримують фермент з наступними властивостями: час напівінактивації при 37 °С нативного ферменту становить 72 год; максимальна активність нативного ферменту проявляється при рН 7,0-10,0; температурний оптимум нативного ферменту відзначається при 52 °С, з підвищенням температури його активність різко падає.

Фермент від біомаси відділяють методом ультрафільтрації. Ультрафільтрація – це один із видів мембранної фільтрації з низьким тиском, яка відокремлює колоїдні частинки у високомолекулярні речовини, розмір яких лежить у діапазоні 1-10 μм, у цей діапазон потрапляють колаген, казеїн, сироваткові білки, великі молекули жиру.

Робочий тиск загалом не перевищує 1 МПа. Ультрафільтраційні мембрани є також основою, на яку накладають композитні мембрани, що застосовуються в інших процесах, таких як зворотний осмос, первапорація і сепарація газів. Ультрафільтрацію застосовують насамперед для кларифікації

розчинів, тобто видалення з них великих, колоїдних частинок, і навіть згущення білкових розчинів. Процес ультрафільтрації здійснюють в модулі AP-2 із заправленими до нього мембранами ВПУ-15.

#### *ДР 6. Підготовка сировини*

##### *ДР 6.1. Стерилізація сировини*

Процес стерилізації сировини забезпечує захист від контамінації мікроорганізмами з навколишнього середовища. Оскільки при автоклавуванні може відбутися денатурація білків шкіряних відходів, проводять стерилізацію опроміненням. Вимоги до цього методу стерилізації описані в стандарті ДСТУ EN ISO 11137-1 а також регламентуються нормативними актами України в сфері охорони праці.

##### *ДР 6.2. Подрібнення сировини*

Подрібнення сировини збільшує робочу поверхню для дії ферментів. Сировина з резервуара подається на дробильну систему подрібнювача. Після подрібнення сировини розмір часток має відповідати у діаметрі 10 мм.

##### *ДР 6.3. Нагрівання сировини*

Після подрібнення сировини проводять її нагрівання до температури +40 °С у ферментері.

#### *ДР 7. Попередня холодна регенерація масла з сировини*

Для першого виділення системи масло/жир перед процесом ферментації може використовуватися холодна регенерація масла, після стадії нагрівання сировини. Холодна регенерація масла має стадії: центрифугування в горизонтальній роторній центрифугі деканційного типу, результатом центрифугування сировини є розділення рідких і твердих частинок на дві різні фракції; виділення масла з рідкої фази. Виділення проводиться через масляний фільтр до резервуару для регенерації масла перед стадією гідроліза; змішування твердої фази й важкої фази зі стадії поділу і перекачування суміші в ферментер.

Контроль умов у ферментері проводиться безперервно, автоматично та шляхом відбору проб. Для підтримки стабільних умов ферментації та режимів, проводять відповідним чином введення різних добавок.

#### *ДР 8. Підготовка реагентів*

##### *ДР 8.1. Дозування реагентів в прилади подачі*

Для забезпечення якісного процесу потрібно підтримувати стабільне значення рН. Для цього кістне борошно, азот, сухий кальцій (кожний компонент окремо) поступають в прилади подачі даних речовин.

#### *ТП 9. Ферментний гідроліз у реакторі*

На стадії ТП 9 відбувається забезпечення виробничого процесу відповідними умовами для ферментативного гідролізу. Дотримання таких умов забезпечить ефективне виділення білків.

Фермент після ультрафільтрації, сировину закачують у реактор. Додають воду очищену температурою 45-52 °С, яка відповідає температурі ферментації, з нейтральним значенням рН. У реактор також подається сировина з стадії нагрівання. Для коригування значення рН в гідролізат можна додавати кісткове борошно, кальцій і азот, з апаратів подачі..

Протягом всього часу ферментації проводять інтенсивне перемішування та аерацію середовища. Концентрація гідролізату в даних умовах досягає 85 г/л. Процес екстрагування колагену в ферментері протікає при інтенсивному перемішуванні і аерації середовища протягом 6 год. Гідролізат поступає на стадію видалення твердих часток. Постійний контроль кількості амінозв'язанного азоту, загального білка, рН і відповідність показників контролю установленим параметрам, забезпечують стабільні умови ферментації. Гідролізат безперервно прокачують через систему видалення колагену, амінокислот та інших пептидів.

#### *ТП 10. Видалення твердих частинок*

##### *ТП 10.1. Просіювання твердих частинок*

На даній стадії проводиться видалення з гідролізату твердих частинок і негідролізованих білків, які можуть повертатися на стадію ферментативного

гідролізу. Тверді частинки розміром більше 1 мм можуть безперервно або періодично видалятися з гідролізату за допомогою ситової фільтраційної системи. Дія протеолітичного ферменту припиняється внаслідок зниження температури.

#### *ТП 10.2. Центрифугування гідролізату*

Потік, з білків, ферментів, жирів, пептидів і вільних амінокислот, в склад якого входять видалені тверді частинки направляється до центрифуги. В результаті центрифугування відбувається відокремлення.

#### *ТП 10.3. Флотація гідролізату*

Потім видалені частинки можуть відділятися відповідно до їх щільності за допомогою процесу флотації. Процес проводять на флотаційному резервуарі для розділення білків та гідроксиапатиту.

#### *ТП 11. Декантація гідролізату*

На даній стадії проводиться очищення пептидного гідролізату від жиру. В операції застосовуються апарати: деканційна центрифуга, сепараційний пристрій для відділення масла, мембранний фільтраційний. Відстійник декантатор розташовується до масляного сепаратора і мембранного фільтру. Ця операція в трифазному сепараторі, з метою зниження навантаження на наступний мембранний фільтр. Відстійник призначений для відділення твердих частинок, з щільністю більшою за густину рідини. Також може використовуватися флотаційний пристрій.

#### *ТП 12. Поділ гідролізату на фракції*

На даній стадії проводиться відділення гідролізату від жирової фракції. Білковий гідролізат відділяється від легшої жирової фракції за допомогою трифазного сепаратора. Вибір режиму відділення залежить від кількості жиру в сировині. Гідролізат передається до ТП 13.

#### *ТП 13. Мембранна фільтрація*

На даній стадії проводиться очищення білкового гідролізату. Перекачування гідролізату проводять через мембранний фільтр, завдяки чому, через мембрану проникають лише молекули пептидів певного розміру

(<10000 дальтона). При проведенні фільтрації гідролізат прокачується через безліч трубчастих або плоских мембран. Робочий тиск 9 бар, продуктивність 8 м<sup>3</sup>/хв. Транспорт через мембрани базується на принципах осмосу. В результаті фільтрації утворюється дистильована вода, як побічний продукт, частина води повертається на фільтр. Порції гідролізату, що не проникають через мембранний фільтр, повертають на стадію гідролізу.

#### *ТП 14. Виділення колагену типу I*

Виділення колагену типу I проводять методом фільтрації. На першому етапі фільтрації використовують мембранні фільтри з діаметром отворів більшим за розмір молекул колагену, що забезпечує їх проходження через фільтр. Більші за розміром молекули білків залишаються на фільтрі. На другій стадії фільтрації використовують фільтри з діаметром пор меншим за розмір молекул колагену. В результаті фільтрації білки менші за розміром за колаген проходять через фільтр, а колаген залишається на фільтрі.

#### *ТП 15. Концентрація продукту*

Отриманий продукт подають на стадію концентрації. Мета цієї операції видалення води перед проведенням сушіння. Дана операція забезпечує бажаний для рідкого продукту рівень концентрації колагену. Найкраще застосовувати дистиляцію типу вакуумного випаровування. Використовують апарат з природною циркуляцією та виносною гріючою камерою [54, 38], який концентрує рідину при низькій температурі, що забезпечує цілісність пептидів колагену. На стадію поступає продукт, вакуум, насичена водяна пара (P=0,3МПа). Випаровування здійснюється при температурі 50-85 °С, при пониженому тиску 0,045 МПа, до концентрації 38-40%.

#### *ТП 16. Сушіння продукту*

##### *ТП 16.1. Сушіння в сушарці*

Після концентрації продукт піддається сушінню. Спочатку продукт сушать до стану порошку в розпилувальній сушарці, з наступною стадією охолодження. Після охолодження продукт піддають грануляції. Температура

висушування становить 120-140 °С до вологості 7-9%. Порошок передають на стадію гранулювання.

#### *ТП 16.2. Гранулювання*

В процесі гранулювання гранулят формується в результаті інтенсивного руху, псевдорозрідження. На отриману масу розпилують концентр зі стадії ТП 14, що забезпечує поступове утворення грануляту при перемішуванні 35-40 об/хв. Всі операції проводяться в безперервно. По закінченню процесу крізь гранулят пропускають сухе холодне повітря, щоб матеріал став твердішим. Проводять просівання грануляту з відбором необхідних фракцій. Дуже дрібні частинки повертають на додаткову грануляцію, а частинки вище номінального розміру подрібнюють та просівають. Колаген, отриманий таким способом становить, мас. %: 50-60 вміст жиру – менш як 0,5; вміст мінеральних речовин – менше 1.

#### *ТП 17. Стандартизація продукту.*

Колагеновий препарат повинен відповідати вимогам ДСТУ 4766:2007 «Маски косметичні».

#### *ТП 18. Фасування, маркування, пакування*

##### *ТП 18.1. Фасування*

Фасування продукту проводять на фасувальній лінії. Проводять контроль маси однієї дози. Після дозування саше з продуктом переміщується на запаювання. Проводять контроль запаювання кожної одиниці продукції.

##### *ТП 18.2. Маркування*

Подальше саше поступають на етикетувальну лінію для наклеювання етикетки з вказівкою назви продукції, серії, дати виготовлення, терміну придатності.

##### *ТП 18.3 Пакування*

Пакування проводять на пакувальному столі по 10 саше в пачку, при цьому контролюють кількість в пачці, відповідність інформації на етикетці.

Готову продукцію після контролю якості передають на склад готової продукції.

## Висновки до розділу 2

У другому розділі описано властивості сировини для отримання колагену типу 1 – колагенвмісних відходів шкіряного виробництва, біологічного агента – бактерії *Bacillus subtilis* та наведено характеристику цільового продукту. Пропонується отримання колагену типу 1 як сировини для косметичних масок для шкіри та волосся.

Описано методи вилучення колагену. Обґрунтовано вибір ферментативного методу гідролізу як найбільш оптимального.

Представлено блок-схему досліджуваної технології та технологічної схеми отримання порошкоподібного препарату колагену, які передбачають стадії санітарної підготовки приміщень, води, повітря та сировини; отримання посівного матеріалу; нарощування культури біологічного агента; ферментативний гідроліз відходів шкіряного виробництва; виділення колагену типу 1; сушіння отриманого продукту та його фасування, пакування, маркування.



## РОЗДІЛ 3 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

### 3.1 Методи контролю препаратів колагену на стадії отримання

Мікробіологічний та технічний контроль проводиться на кожній стадії виробництва [41]. З метою контролю умов виробництва, стану апаратів та контролю процесу виробництва технологічна лінія оснащується контрольно-вимірювальними приладами.

Технічний контроль – це перевірка відповідності якості продукції. На стадії виготовлення продукції технічний контроль охоплює якість, комплектність, пакування, маркування, хід виробничих процесів [68].

Об'єктами технічного контролю вважаються матеріали і напівфабрикати, що надходять на підприємство, продукція підприємства на всіх стадіях її виготовлення та у готовому вигляді, технологічні процеси, знаряддя праці, технологічна дисципліна і загальна схема виробництва. [70]

Важливими показниками продукції є витрата часу та засобів на її виготовлення. Також продукт повинен відповідати усім вимогам конструкторсько-технологічної документації. За все це відповідає технічний контроль. Це структуровані контрольні операції які виконуються у строго визначеному порядку, а виконанням цих процесів, зазвичай, займаються працівники, які безпосередньо виконуються цю виробничу операцію. Але для належного забезпечення усіх норм та правил іноді технічний контроль проводиться майстрами, бригадирами, або ж спеціальним персоналом в тому числі заводського технічного контролю [70]

Технічний контроль важливо організувати доцільно та раціонально. Для цього застосовуються такі принципи:

- всі стадії та фактори виробничого процесу повинні підлягати технічному контролю;
- технічний контроль повинен враховувати технологію виробництва та організацію підприємства;

- організація технічного контролю повинна виконуватись на основі належних економічних розрахунків;
- розподіл обов'язків між виконавцями та підрозділами підприємства має бути раціональним та обґрунтованим;
- технічний контроль має враховувати статистичний контроль мотивації співробітників підприємства.

Для забезпечення якості продукції на виробництві необхідно підтримувати високий рівень санітарії та гігієни. Для цього потрібно контролювати щоб поточні й генеральні прибирання, мийка та дезінфекція приміщень, технічного обладнання, інвентарю проводились своєчасно та в повному обсязі. При цьому миючі та дезінфікуючі засоби повинні бути ефективними, володіти певними функціональними властивостями та бути безпечними для персоналу, навколишнього середовища а також для об'єктів обробки [68].

#### *Контроль концентрації біомаси*

Концентрацію мікробних клітин в 1 мл культуральної рідини визначають на КФК-2 МП при довжині хвилі 540 нм.

#### *Контроль концентрації розчиненого кисню*

Концентрацію розчиненого кисню в культуральному середовищі визначали за допомогою портативного оксиметру.

#### *Контроль протеолітичної активності*

Визначення протеолітичної активності проводять гідролізом 1% розчину казеїну, очищеного по Гамерстену. За одиницю протеолітичної активності приймають кількість ферменту, яка за 1 хв при 37 °С підвищує в неосаджуваних трихлороцтовою кислотою продуктах протеолізу вміст тирозину на 1 мікроеквівалент або за 10 хв при тій же температурі підвищує оптичну щільність розчину при 280 нм на 1 одиницю.

#### *Контроль вмісту білка*

Концентрацію білку в розчинах визначають методом Лоурі .

#### *Контроль величини питомої активності*

Питому активність розраховують як відношення величини протеолітичної активності до величини концентрації білка й виражають у ПЕ/мг білка.

#### *Контроль виходу ферменту на стадії очищення*

Вихід ферменту оцінюють за співвідношенням загальної протеолітичної активності до стадії очищення і після стадії очищення і виражають у відсотках.

### **3.2 Методи контролю готового продукту**

Для контролю якості готового продукту потрібно відібрати пробу згідно розділу 2 ГОСТ 29188.0 Для визначення органолептичних та фізико-хімічних властивостей маса середньої сукупної проби косметичної маски повинна бути не менше 150г. Маса середньої сукупної проби для визначення мікробіологічних показників має бути не менше 15г.

Спочатку відбираються проби для мікробіологічних досліджень, при цьому дотримуються правила асептики для того, щоб запобігти вторинному мікробному забрудненню косметичного продукту.

Точкова проба – проба, відібрана за один прийом від окремої одиниці продукції. Точкові проби з'єднують, перемішують і складають середню сукупну пробу.

Пакування спожиткової тари з якої відбирається середня проба повинно бути непошкодженим та не зазнавати зовнішнього впливу. Якщо пакування пошкоджене, це обов'язково заноситься до протоколу. Місце з'єднання кришки із тарою протирається етиловим ректифікованим спиртом, після чого споживча тара розкривається. Проби відбирають у боксі поблизу полум'я пальника стерильним пінцетом у стерильну колбу із широким горлом і закупорюють ватно-марлевым тампоном. Першу порцію кількістю 10 % вмісту тари відбирають у окремий посуд і викидають.

*Зовнішній вигляд* визначають згідно з розділом 3 ГОСТ 29188.0.

*Колір* визначають згідно з розділом 3 ГОСТ 29188.0.

*Запах* визначають згідно з розділом 3 ГОСТ 29188.0.

*Масова частка води та летких речовин* повинна визначатися згідно з ГОСТ 29188.4.

Під час підготовки до випробування річковий пісок промивається водою, після чого на 24 год заливається розчином соляної кислоти.

Потім пісок має бути промитий дистильованою водою до нейтральної реакції по оранжевому метиловому і висушений на повітрі. Після просіювання через дротяну сітку пісок прожарюється 5 годин у муфельній печі за температури 500 °С. Зберігається очищений і прожарений пісок у чистій щільно закритій банці.

У стаканчик для зважування з 10-12 г очищеного та прожареного річкового піску поміщається скляна паличка. Стаканчик із вмістом висушується у сушильній шафі при температурі (103±2) °С доти, поки розбіжність між двома послідовними зважуваннями не перевищуватиме 0,002 г.

Під час випробування у склянку зі скляною паличкою та підготовленим піском поміщається від 1,5 до 5,0 г аналізованого продукту, зважується, результат записується до четвертого десяткового знака. Вміст стаканчика ретельного перемішується, після чого поміщається у сушильну шафу і сушиться 3 години при температурі (103±2) °С. Висушування повторюється доти, поки розбіжність між двома послідовними зважуваннями не перевищуватиме 0,002 г (кожне повторне висушування проводять протягом 30 хв).

Масова частка води та летких речовин ( $X_1$ ) у відсотках обчислюють за формулою

$$X_1 = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100$$

Масову частку сухої речовини ( $X_2$ ) у відсотках обчислюють за формулою

$$X_2 = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \times 100$$

де  $m_1$ - маса стаканчика з піском та скляною паличкою, г;

$m_2$  - маса стаканчика з піском, скляною паличкою та продуктом до висушування, г;

$m_3$  - маса стаканчика з піском, скляною паличкою та продуктом після висушування, г.

За результат випробування приймається середнє арифметичне результатів двох паралельних визначень, допустима розбіжність між якими не повинна перевищувати:

1,0% – для продуктів з масовою часткою води та летких речовин або сухої речовини понад 50%; 0,5% - для продуктів з масовою часткою води та летких речовин або сухої речовини від 10 до 50%; 0,2% - для продуктів із масовою часткою води та летких речовин або сухої речовини не менше 10%;

Інтервал сумарної похибки виміру відповідно  $\pm 0,5\%$ ;  $\pm 0,3\%$  та  $\pm 0,1\%$  при довірчій ймовірності 0,95.

*Водневий показник (рН)* визначається згідно з ГОСТ 29188.2 у розчині із масовою часткою косметичної маски 10 %. Для цього у склянку з 90 см дистильованої води додається 10,00 г продукції та перемішується скляною паличкою.

В склянку з приготовленим розчином, місткістю 100 см<sup>3</sup> поміщаються кінці електродів. Вони не мають торкатися стін і дна склянки. Показники величини рН за шкалою приладу знімаються після того як показання приладу приймуть певне значення.

Кінцевим результатом випробування вважається середньоарифметичне значення результатів двох паралельних визначень. Отриманий результат заокруглюється до першого десяткового знака.

*Колоїдну стабільність* визначають згідно з ГОСТ 29188.3.

*Термостабільність* визначають згідно з ГОСТ 29188.3.

Методи визначення *мікробіологічних показників* полягають у висіванні розчину наважок відібраної проби косметичної маски в живильні середовища

з подальшим культивуванням посівів в умовах, сприятливих для росту мікроорганізмів.

*Визначання бактерій Enterobactereaceae* згідно з ДСТУ 3034 (ГОСТ 30282). Метод виявлення умовно-патогенних бактерій *Escherichia coli* (*E. coli*) містить в собі такі процедури:

- посів на рідке середовище з глюкозою для накопичування бактерій родини *Enterobacteria*, у тому числі *E. coli*;
- пересів накопичуваної культури на тверде середовище Ендо для одержання окремих колоній та виявлення *E. coli* за характерними культуральними ознаками та здібністю забарвлюватися за Грамом;
- посів передбачуваних *E. coli* на середовищі Козера для визначення здібності засвоювати цитрат натрію та на середовищі Ейкмана для визначення здібності рости за температури від 43 до 44 °С.

#### Отримання накопичуваної культури

По 1 см<sup>3</sup> середньої проби досліджуваного засобу вноситься у три пробірки з 10 см<sup>3</sup> збагаченого середовища. Посіви інкубують у термостаті за температури (37±1) °С протягом 18-24 год. Ріст ентеробактерій супроводжується виділенням газу та підкисленням середовища. Кислотоутворення визначається за появою жовтого забарвлення середовища, газоутворення - за наявністю газу в поплавцях.

#### Отримання окремих колоній на середовищі Ендо

1-2 краплини накопичуваної культури, попередньо перемішаної продуванням повітря через піпетку, переносяться на поверхню середовища *E. coli* і розтирається стерильним скляним шпателем, потім тим самим шпателем робиться посів на другу чашку для отримання окремих колоній. Чашки з посівами витримуються у термостаті за температури (37±1) °С протягом 18-24 год. Ешерихії утворюють на середовищі Ендо червоні з металевим блиском, рожеві, блідо-рожеві колонії. З ізольованих колоній робляться препарати і забарвлюються за Грамом згідно з ГОСТ 10444.1 чи ГОСТ 18963.

Наявність в досліджуваних зразках грамнегативних паличок, які зброджують лактозу з утворенням кислоти і газу, які утворюють на середовищі Ендо забарвлені непрозорі блискучі колонії вказує на наявність в зразках бактерій *Escherichia*, а саме *E. coli*. Відсутність бактерій, які зброджують лактозу з утворенням кислоти і газу вказує на відсутність ешеріхій в досліджуваному матеріалі.

*Визначання Staphylococcus aureus* згідно з ДСТУ 3031 (ГОСТ 30279).

Метод виявлення умовно патогенних бактерій *Staphylococcus aureus* (*St. aureus*) містить в собі такі процедури:

- одержання накопичуваної культури *S. aureus* шляхом посіву середньої проби на МПБ з хлористим натрієм;
- одержання ізольованих колоній шляхом пересіву на жовтково-сольовий агар та виявлення лецитиназної активності;
- виділення бактерій у чисту культуру;
- фарбування за Грамом;
- виявлення каталазної активності;
- виявлення коагулязної активності;
- виявлення гемолітичної активності.

Усі посіви проводяться у боксі біля полум'я пальника.

Отримання накопичувальної культури *S. aureus*

По 1 см<sup>3</sup> середньої проби досліджуваного засобу вносяться у 3 пробірки з 10 см<sup>3</sup> МПБ з хлористим натрієм з додаванням сироватки та лецитину для інактивації консерванту. Добре перемішуються. Посіви інкубуються у термостаті за температури (37±1) °С протягом 18-24 год.

Отримання ізольованих колоній та виявлення лецитиназної активності.

Культура на МПБ розсівається на жовчно-сольовий агар. Розсів робиться таким чином, щоб одержати окремі колонії. Для цього дно чашки розкреслюється на три частини літерою Т і петлею частим штрихом засіваються. Посів інкубується від 24 до 48 год за температури (37±1) °С. На жовчно-сольовому агарі стафілококи утворюють опуклі непрозорі колонії

середньої величини, гомогенні чи дрібнозернистої структури, звичайно забарвлені у жовтий, золотавий, кремовий колір. Більшість патогенних стафілококів на цьому середовищі викликають лецитиназу (жовткову) реакцію: навколо колоній утворюється зона помутніння з перламутровим облямуванням, добре видимим у відбитому світлі.

Виділення бактерій у чисту культуру.

Із трьох-п'яти характерних колоній бактерії виділяються у чисту культуру. Для цього робиться петлею посів на зкошений МПА. Пробірки інкубуються за температури  $(37\pm 1)$  °С протягом 18-24 год. Бактерії, що вирости, використовуються для подальшої ідентифікації за такими ознаками, як забарвлення за Грамом, каталазна активність, анаеробне утворення кислоти на середовищі з манітом і коагулювання плазми крові.

*Фарбування за Грамом*

Для приготування препаратів для забарвлення за Грамом на чисте знежирене у суміші Никифорова чи нагріванням за температури 400 °С протягом 20 хв предметне скло наноситься крапля фізіологічного розчину чи водопровідної води, бактеріологічною петлею вноситься невелика кількість бактеріальної маси і розподіляється тонким шаром, на площі близько 1 см. Препарат висушується у повітрі, фіксується жаром, проводячи скло 2—3 рази над полум'ям пальника. Забарвлення за Грамом проводиться згідно з ГОСТ 18963. Забарвлені мазки мікроскопуються з використанням масляної імерсії з окуляром 10х чи 15х і об'єктивами 90—120х. Грампозитивні бактерії утворюють з основними барвниками стійкі сполуки і забарвлюються у синє-фіолетовий колір. Грамнегативні гублять основний барвник і набувають червоного кольору додаткового фарбувального розчину. *S. aureus* — грампозитивні і кулькоподібні бактерії, розташовуються поодиночці, попарно чи утворюють неправильні скупчення.

*Виявлення каталазної активності.*

Для виявлення каталазної активності відбирається петлею трохи бактеріальної маси і розміщують на чистому знежиреному предметному склі.



Вноситься краплина перекису водню з масовою часткою 3 % і одразу ж закривається покривним склом. Якщо протягом 3 хв виділення газу не спостерігається, відмічається відсутність каталазної активності. Виділення газу свідчить про каталазо-позитивну реакцію. *S. aureus* — каталазопозитивні бактерії.

#### *Виявлення коагулазної активності*

Найважливішою диференціальною ознакою для патогенних стафілококів є здатність коагулювати плазму крові кроля. Для виявлення плазмокоагулази цитратна плазма крові розливається у стерильні пробірки по 0,5 см<sup>3</sup>. Посів виконується петлею. Пробірки витримуються у термостаті за температури (37±0,5) °С 3-6 год. Якщо через 6 год коагуляція плазми не настала, пробірка залишається за температури 30 °С на 24 год. Якщо через 24 год плазма не зсілася, то досліджувана культура стафілокока відноситься до коагулазонегативної. Для зручності виявлення коагуляції допускається паралельний посів у цитратну плазму музейного штаму *S. aureus*, а як контроль – термостатування незасіяної плазми. Реакція вважається позитивною, якщо у пробірці утворився компактний згусток чи зкоагулювала вся плазма.

В разі виявлення *S. aureus* у посівах з середньої проби, вказують на наявність цих бактерій у виробі, що аналізується. При відсутності у посівах *S. aureus* вироб вважають незабрудненим патогенним стафілококом.

*Визначання Pseudomonas aeruginosa* згідно з ДСТУ 3033 (ГОСТ 30281).

*Визначання кількості дріжджів і пліснявих грибів* згідно з ДСТУ 3032 (ГОСТ 30280)

Правильність пакування і маркування на відповідність вимогам стандартів контролюють візуально.

### Висновки до розділу 3

Проведення мікробіологічного та технічного контролю на кожній стадії виробництва є запорукою отримання високоякісного готового продукту. Об'єктами технічного контролю є: сировина, матеріали, продукція підприємства на всіх стадіях, готова продукція, технологічні процеси, обладнання тощо.

Дотримання належної гігієни та санітарії є дуже важливим при функціонуванні підприємства.

Особливостями контролю технологічних операцій є контроль концентрації біомаси, розчиненого кисню, протеолітичної активності, отриманого ферменту, вмісту білка.

Контроль готового продукту виконують за ДСТУ 4766:2007 «Маски косметичні». Контролюють зовнішній вигляд, колір, запах продукту. Визначають водевий показник, вміст вологи та летких речовин, а також присутність та кількість *Enterobactereaceae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, а також дріжджів і пліснявих грибів.

## ВИСНОВКИ

1. У роботі проведено критичних огляд науково-технічної літератури, присвяченої вивченню властивостей та способів отримання колагену типу 1. Встановлено, що застосування цього білку є перспективним в різних галузях промисловості, в тому числі і з косметичною метою.

2. Обрано сировину та біологічний агент для отримання колагену типу 1. Описано фізико-хімічні властивості сировини – зеленої голинної обрізі підприємства ПрАТ «Чинбар», м. Київ, а також властивості біологічного агента та цільового продукту.

3. Обґрунтовано технологічну схему отримання готового продукту. Найперспективнішим є ферментативний метод гідролізу колагену, тому запропоновано використання бактерії *Bacillus subtilis* 3H, як продуцента протеази для здійснення гідролізу колагену типу 1.

4. Обґрунтовано способи виділення та очищення готового продукту, які передбачають санітарну підготовку приміщень, води, повітря та сировини; отримання посівного матеріалу; нарощування культури біологічного агента; ферментативний гідроліз відходів шкіряного виробництва; виділення колагену типу 1; сушіння отриманого продукту та його фасування, пакування, маркування. Вказано оптимальні параметри кожної стадії виробничого процесу, сформовано та описано технологічну схему виробництва.

5. Описано особливості технологічного та мікробіологічного контролю сировини, технологічних процесів, матеріалів, проміжної та готової продукції.

6. Особливості контролю готової продукції регулюються ДСТУ 4766:2007 «Маски косметичні».

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. 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), 20–26.
2. Baumann L., Kaufman J., Saghari S. Collagen fillers. *Dermatol. Ther.* 2006, 19 (3), 134–140.
3. Bella J., Brodsky B., Berman H.M.: Hydration structure of a collagen peptide. *Structure.* 9, 893-906, (1995).
4. Boyd M., Flasz M., Johnson P. A., Roberts J. S., Kemp P. Integration and persistence of an investigational human living skin equivalent (ICX-SKN) in human surgical wounds. *Regen. Med.* 2007, 2 (4), 363–370.
5. Brodsky B., Ramshaw J.A.M.: The collagen triple-helix structure. *Matrix Biol.* 15, 545-554, (1997).
6. Caball -Serrano J., Zhang S., Sculean A., Staehli A., Bosshardt D. D. Tissue Integration and Degradation of a Porous Collagen-Based Scaffold Used for Soft Tissue Augmentation. *Materials (Basel).* 2020, 13 (10), 2420.
7. Chakraborty P. D., De D., Bandyopadhyay S., Bhattacharyya D. Human aqueous placental extract as a wound healer. *J. Wound. Care.* 2009, 18 (11), 462–467.
8. Cisneros D. A., Hung C., Franz C. M., Muller D. J. Observing growth steps of collagen selfassembly by time-lapse high-resolution atomic force microscopy. *J. Structural Biol.* 2006, 154 (3), 232–245.
9. De D., Datta Chakraborty P., Mitra J., Sharma K., Mandal S., Das A., Chakrabarti S., Bhattacharyya D. Ubiquitin-like protein from human placental extract exhibits collagenase activity. *PloS One.* 2013, 8 (3)
10. Dietrich F, Duré GL, Klein CP, Bampi VF, Padoin AV, Silva VD, Braga-Silva J. Platelet-rich fibrin promotes an accelerated healing of achilles tendon when compared to platelet-rich plasma in rat. *World J Plast Surg.* 2015, 4, 101–9.

11. Folmsbee MJ, et al. Anaerobic growth of *Bacillus mojavensis* and *Bacillus subtilis* requires deoxyribonucleosides or DNA. *Applied and environmental microbiology*. 2004, 70, 5252–5257.
12. Gatseva A., Sin Y. Y., Brezzo G., Van Agtmael T. Basal membrane collagens and disease mechanisms. *Essays Biochem*. 2019, 63 (3), 297–312.
13. Gelse K., Pöschl E., Aigner T.: Collagens-structure, function, and biosynthesis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 1531-1546, (2003).
14. Gulevsky A. K., Abakumowa E. S., Shenyavsky I. I. Biological activity of low molecular weight fraction obtained from cord and peripheral blood in cows of different ages. *Fiziol. Zh.* 2017, 63 (2), 73– 79.
15. Halim NRA, Yusof HM, Sarbon NM. Functional and bioactive properties of fish protein hydolysates and peptides: a comprehensive review. *Trends Food Sci Technol*. 2016, 51, 24–33.
16. Hoa TT, et al. Fate and dissemination of *Bacillus subtilis* spores in a murine model. *Applied and environmental microbiology*. 2001;67:3819–3823.
17. Hong HA, et al. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS microbiology reviews*. 2005, 29, 813–835
18. Hosseinkhani M, Mehrabani D, Karimfar MH, Bakhtiyari S, Manafi A, Shirazi R. Tissue engineered scaffolds in regenerative medicine. *World J Plast Surg*. 2014, 3, 3–7.
19. Kadler K. E. Fell Muir Lecture: Collagen fibril formation in vitro and in vivo. *Int. J. Exp. Pathol*. 2017, 98 (1), 4–16.
20. Kang HK, Seo CH, Park Y. Marine peptides and their antiinfective activities. *Marine drugs*. 2015;13(1):618-654.
21. Katayama K., Seyer J. M., Raghow R., Kang A. H. Regulation of extracellular matrix production by chemically synthesized subfragments of type I collagen carboxy propeptide. *Biochemistry*. 1991, 30 (29), 7097–7104.
22. Kim SK, Wijesekara I. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: a review. *J Funct Foods*. 2010;2:1–9.

23. Kim, S.K. Marine cosmeceuticals. *J. Cosmet. Dermatol.* 2014, 13, 56–67.
24. Kim, S.-K. *Marine Proteins and Peptides: Biological Activities and Applications*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2013.
25. Kirkness M. W., Lehmann K., Forde N. R. Mechanics and structural stability of the collagen triple helix. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2019, V. 53, P. 98–105.
26. Kunst F, et al. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature.* 1997, 390, 249–256
27. La Ragione RM, et al. *Bacillus subtilis* spores competitively exclude *Escherichia coli* O78:K80 in poultry. *Veterinary microbiology.* 2001;79:133–142.
28. Lafarga T, Hayes M. Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients. *Meat sci.* 2014, 98, 227–239.
29. Leser TD, et al. Germination and outgrowth of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* spores in the gastrointestinal tract of pigs. *J Appl Microbiol* 2007.
30. Lund L. R., Romer J., Bugge T. H., Nielsen B. S., Frandsen T. L., Degen J. L., Stephens R. W., Dan K. Functional overlap between two classes of matrix-degrading proteases in wound healing. *EMBO J.* 1999, 18 (17), 4645–4656.
31. Maistrenko L., Iungin O., Savchuk O., Okhmat O. Collagen matrices from leather industry wastes for biomedical application. *ICAMS 2020. Advanced materials and systems* : Proceedings of the 8th International Conference, October 1st-3rd. Bucharest : INCDTP-ICPI. 2020, P. 195-200.
32. Martins VG, Costa JAV, Hernandez CP. Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina. 2009.
33. Mienaltowski M. J., Birk D. E. Structure, physiology, and biochemistry of collagens. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2014, V. 802, P. 5–29.
34. Minakowski W., Weidner S.: *Biochemia kregowców*. PWN. Warszawa 2005.

35. Mousavi S., Khoshfetrat A. B., Khatami N., Ahmadian M., Rahbarghazi R. Comparative study of collagen and gelatin in chitosanbased hydrogels for effective wound dressing: Physical properties and fibroblastic cell behavior. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019, 518 (4), 625–631.
36. Myllyharju J., Kivirikko K.I.: Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet.* 20, 33-43, (2004), Ricard-Blum S., Ruggiero F.: The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Path. Biol.* 53, 430-442, (2005).
37. Myllyl R., Tuderman L., Kivirikko K. I. Kinetic analysis of the reaction sequence. *Eur. J. Biochem.* 1977, 80 (2), 349–357.
38. Ngo DH, Vo TS, Ngo DN, et al. Biological activities and potential health benefits of bioactive peptides derived from marine organisms. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2012;51(4):378-383.
39. 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), 797–806.
40. Olsen D. R., Leigh S. D., Chang R., McMullin H., Ong W., Tai E., Chisholm G., Birk D. E., Berg R. A., Hitzeman R. A., Toman P. D. Production of human type I collagen in yeast reveals unexpected new insights into the molecular assembly of collagen trimers. *J. Biol. Chem.* 2001, 276 (26), 24038–24043.
41. Patent. 2333663 Aminotek Ас: Способ получения пептидов из сырья, содержащего белок, продукты, получаемые таким способом, и применение этих продуктов.
42. Patino M. G., Neiders M. E., Andreana S., Noble B., Cohen R. E. Collagen as an implantable material in medicine and dentistry. *J. Oral. Implantol.* 2002, 28 (5), 220–225.
43. Rappu P., Salo A. M., Myllyharju J., Heino J. Role of prolyl hydroxylation in the molecular interactions of collagens. *Essays Biochem.* 2019, 63 (3), 325–335.

44. Reddy B., Jow T., Hantash B. M. Bioactive oligopeptides in dermatology: Part I. *Exp Dermatol.* 2012, 21 (8), 563–568.
45. Ricard-Blum S. The collagen family. Cold Spring Harb. *Perspect. Biol.* 2011.
46. Rizk M. A., Mostafa N. Y. Extraction and Characterization of Collagen from Buffalo Skin for Biomedical Applications. *Orient. J. Chem.* 2016, 32 (3).
47. Robinson L. R., Fitzgerald N. C., Doughty D. G., Dawes N. C., Berge C. A., Bissett D. L. Topical palmitoyl pentapeptide provides improvement in photoaged human facial skin. *Int. J. Cosmet. Sci.* 2005, 27 (3), 155–160.
48. Soroushanova A., Delgado L. M., Wu Z., Shologu N., Kshirsagar A., Raghunath R., Mullen A. M., Bayon Y., Pandit A., Raghunath M., Zeugolis D. I. The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. *Adv. Mater.* 2019.
49. 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), 54–57.
50. Tam NK, et al. The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. *J Bacteriol.* 2006;188:2692–2700.
51. Van Doren S. R. Matrix metalloproteinase interactions with collagen and elastin. *Matrix Biol.* 201, V. 44–46, P. 224–231.
52. Vaskovych A. M., Repin M. V., Marchenk L. M., Govorukha T. P., Pasieshvili N. M. Nephroprotective Effect of Placental Cryoextract When Simulating Acute Renal Failure in Rats. *Probl. Cryobiol. Cryomed.* 2019, 29 (2), 183.
53. Vojdani F. Solubility. *Methods of Testing Protein Functionality.* Hall G. M. (Ed). London: St. Edmundsbury Press. 1996, P. 11–60.
54. 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, 221–228.



55. Wang L, Liang Q, Chen T, Wang Z, Xu J, Ma H. Characterization of collagen from the skin of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) *Food Hyd.* 2014, 38, P. 104–109.
56. Ward A, Courts A. The Science and Technology of Gelatin - A Series of Monographs. London: Academic Press, 1977.
57. Yamauchi M., Terajima M., Shiiba M. Lysine Hydroxylation and Cross-Linking of Collagen. *Methods Mol. Biol.* 2019, V. 1934, P. 309–324.
58. 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, 1739–1743.
59. Агжихин И.С. Технология лекарств. М.: Медицина, 1980
60. Антипова Л.В. Сторублевцев С.А. Болгова С.Б. Сухов И.В. Получение, идентификация и сравнительный анализ рыбных коллагенов с аналогами животного происхождения. *Фундаментальные исследования.* – 2015. № 8 (часть 1) С. 9-13.
61. Буева М.В. Ритмичность состояния эпидермиса при репаративной регенерации /М.В. Буева, Г.С. Катинас // *Морфология.* Т. 117, №3. 2000. С. 2
62. Государственный реестр лекарственных средств. Официальное издание: в 2 т.- М.: *Медицинский совет*, 2009. Т.2, ч.1 568 с.; ч.2 - 560 с.
63. Зайдес А.С. Структура коллагена и ее изменения при обработках. – М.: Ростехиздат, 1960. 342 с.
64. Иванова Л.А., Сычеников И.А., Кондратьева Т.С. / Коллаген в технологии лекарственных форм. М.: *Медицина*, 1984, 112 с. ил
65. Игнатьева Н. Ю. Коллаген – основной белок соединительной ткани. *Эстетическая медицина.* 2005. Т. 6, № 3. С. 247-256.
66. Изучение местноанестезирующего и ранозаживляющего действия мазей на гидрофильных основах / С. В. Чащина, В. Э. Колла, Н. А. Горнова и др. // *Фармация.* – 1992. - № 4. – С. 17-20.

67. І.Ю. Царенко, А.О. Рой, І.К. Курдиш оптимізація живильного середовища для культивування *Bacillus subtilis*. ISSN 0201- 8462. *Мікробіол. журн.*, 2011, Т. 73, № 2.
68. Капрельянц Л.В., Пилипенко Л. М., Єгорова А. В. та ін. М 59 *Мікробіологія харчових виробництв: навчальний посібник.*/ Херсон: ОЛДІ-ПЛЮС, 2017. 478 с.
69. Кондратьєва Т.С., Іванова Л.А. та ін *Технологія лікарських форм*/Под. ред. Т.С. Кондратьєвої. У 2-х томах, т. 1. М.: *Медицина*, 1991.
70. Наказ МОЗ України № 548 від 19.07.2012. Про затвердження Мікробіологічних критеріїв для встановлення показників безпечності харчових продуктів.
71. Никитин В. Н., Перский Е. Є., Утевская Л. А. Очерки о тройной спирали. Киев : *Наукова думка*, 1984. 167 с.
72. Новикова І.С., Сторублевцев С.А. Применение коллагена в медицинских целях // *Успехи современного естествознания*. 2012. № 6. С. 136-136.
73. Потехина Ю. П. Структура и функции коллагена. *Российский остеопатический журнал*. 2016, № 1. С. 87–99.
74. Руководство до лабораторним заняттям по аптечній технології лікарських форм /И.М.Перцев, Р.К.Чаговец: Вища шк.Головное вид-во, 1987.
75. Синёв Д.Н., Марченко Л.Г., Синёва Т.Д. Справочное пособие по аптечной технологии лекарств. СПб.: 2001, 316 с.
76. Справочник фармацевта. М.: *Медицина*, 1981.
77. Хазиев А. Ф. Получение и изучение свойств протеазы, синтезируемой *Bacillus subtilis*: автореф. дисс. на получю научн. степени к-та биол. наук: 03.00.07. Москва, 2004. 22 с.
78. Щукина Е.В., Сапожникова А.И. / Е.В. Щукина, А.И. Сапожникова // *Натуральная фармакология и косметология*. 2005, №4, С. 29–34.