МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»	**«До захисту допущено»**
Директор інституту (декан факультету)	Завідувач кафедри
_____ Наталія ГРЕГІРЧАК	_____ Віктор СТАБНІКОВ
(підпис) (прізвище та ініціали)	(підпис) (прізвище та ініціали)
«_02_» _____грудня_____ 2024 р.	«_02_» _____грудня_____ 2024 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

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

освітньо-професійної програми «Промислова та фармацевтична біотехнологія»

на тему: Біотехнологія колагенолітичних ферментів та їх використання у медицині

Виконав: здобувач_ІІ_ курсу, групи_1_

ЛЕЩУК Світлана Василівна _____ _____
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник СКРОЦЬКА Оксана Ігорівна _____
(прізвище , ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти _____ _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

_____ _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

_____ _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент _____ _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

Я як здобувач(ка) Національного університету харчових технологій розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавав(-ла) і не одержував(-ла) недозволеної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2024 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) __Біотехнології та екологічного контролю_____
Кафедра _____біотехнології і мікробіології_____
Освітній ступінь____магістр_____
Спеціальність____162 «Біотехнології та біоінженерія»_____
(код і назва)
Освітньо-професійна програма « Промислова та фармацевтична біотехнологія»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри _біотехнології і_____
_____мікробіології_____

_____Віктор СТАБНІКОВ_

"_08_" ___жовтня___2024 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

_____ЛЕЩУК Світлани Василівни_____
(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи _Біотехнологія колагенолітичних ферментів та їх використання у медицині_____,
керівник роботи _СКРОЦЬКА Оксана Ігорівна к.б.н., доц._____,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)
затверджені наказом закладу вищої освіти від 7 жовтня 2024 року № 876-кс ____
2. Строк подання здобувачем роботи__01.12.2024_____
3. Вихідні дані до роботи цільовий продукт: колагенолітичні ферменти, об'єм ферментера - 1 м^3, коефіцієнт заповнення – 0,6_____
4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) _РОЗДІЛ 1. Мікробна природа колагенолітичних ферментів; РОЗДІЛ 2. Оптимізація біотехнологічних процесів отримання мікробних колагеназ; РОЗДІЛ 3. Інноваційні напрямки у використанні колагенолітичних ферментів у медицині; РОЗДІЛ 4. Техніко-економічне обґрунтування виробництва субстанції для лікарського засобу (лз); РОЗДІЛ 5. Обгрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу субстанції та технологічної схеми одержання ЛЗ; РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання; РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення і очищення субстанції для одержання ЛЗ; РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва_____
5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема післяферментаційного виділення і очищення субстанції для одержання ЛЗ формату А2 – 1 аркуш, апаратурна схема післяферментаційного виділення і очищення субстанції для одержання ЛЗ формату А2 – 1 аркуш_____

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв

7. Дата видачі завдання____08 жовтня 2024 року_____

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	РОЗДІЛ 1. Мікробна природа колагенолітичних ферментів	01.10.24 - 10.10.24	
2.	РОЗДІЛ 2. Оптимізація біотехнологічних процесів отримання мікробних колагеназ	11.10.24 -14.10.24	
3.	РОЗДІЛ 3. Інноваційні напрямки у використанні колагенолітичних ферментів у медицині	15.10.24 - 18.10.24	
4.	РОЗДІЛ 4. Техніко-економічне обґрунтування виробництва субстанції для лікарського засобу	19.10.24 - 20.10.24	
5.	РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору стадій технологічного процесу	21.10.24 - 24.10.24	
6.	РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання	25.10.24 - 29.11.24	
7.	РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення і очищення колагенази	30.10.24 - 04.11.24	
8.	РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва субстанції для лз	05.11.24 – 08.11.24	
9.	Оформлення пояснювальної записки	09.11.24 – 11.11.24	
10.	Виконання графічної частини проекту	12.11.24 -14.11.24	

Здобувач _____ Світлана ЛЕЩУК
(підпис) (ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____ Оксана СКРОЦЬКА
(підпис) (ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Колагеназа є важливим ферментом, який знаходить широке застосування в медицині завдяки своїй здатності розщеплювати колаген у сполучній тканині. З огляду на актуальність лікування контрактури Дюпюїтрена, фіброзних рубців і деяких інших патологій, існує потреба у створенні ефективних і безпечних форм цього препарату. Особливий інтерес викликає використання ін'єкційної форми, яка забезпечує локальну дію колагенази, швидкий терапевтичний ефект і мінімальний вплив на здорові тканини.

Метою даного дослідження є розробка субстанції для ін'єкційного препарату на основі колагенази, що дозволить оптимізувати її властивості та забезпечити максимальну ефективність у клінічному застосуванні. Особлива увага приділяється стабільності ферменту, його активності та можливостям точного дозування для локалізованого впливу на уражені тканини.

На основі аналізу та порівняння потенційних продуцентів колагенази, складу поживних середовищ для їх культивування обрано штам *P. aurantiogriseum* URM4622 є найбільш продуктивним мікроорганізмом, тому що виробляє більшу кількість цільового продукту ніж інші продуценти, маючи при цьому нижчу вартість поживного середовища та умовну вартість колагенази, що буде вигідним при масштабному виробництві препарату. Розрахована потужність його виробництва становить 3 кг колагенащи за рік.

Дипломна робота викладена на 101 стр. друкованого тексту, містить 6 таблиць, 10 рисунків і складається з вступу, восьми розділів, списку використаної літератури (121 джерело) та графічної частини (2 креслення формату А2).

Ключові слова: *P. aurantiogriseum,* колагеназа, технологічна схема, допоміжні роботи, виробничий процес, поживне середовище, біологічний агент, ферменти, хвороба Дюпюітрена.

ABSTRACT

Collagenase is an important enzyme that is widely used in medicine due to its ability to break down collagen in connective tissue. Given the relevance of the treatment of Dupuytren's contracture, fibrous scars and some other pathologies, there is a need to create effective and safe forms of this drug. Of particular interest is the use of an injectable form that provides local action of collagenase, rapid therapeutic effect and minimal impact on healthy tissues.

The aim of this study is to develop a substance for an injectable preparation based on collagenase, which will optimize its properties and ensure maximum effectiveness in clinical use. Special attention is paid to the stability of the enzyme, its activity and the possibilities of accurate dosing for localized impact on affected tissues.

Based on the analysis and comparison of potential collagenase producers, the composition of nutrient media for their cultivation, the strain P. aurantiogriseum URM4622 was selected as the most productive microorganism, because it produces a larger amount of the target product than other producers, while having a lower cost of nutrient media and the conditional cost of collagenase, which will be beneficial for large-scale production of the drug. Its estimated production capacity is 3 kg of collagenase per year.

The thesis is presented on 101 pages of printed text, contains 6 tables, 10 figures and consists of an introduction, eight sections, a list of used literature (121 sources) and a graphic part (2 drawings of A2 format).

Keywords: *P. aurantiogriseum*, collagenase, technological scheme, auxiliary works, production process, nutrient media, biological agent, enzymes, Dupuytren's disease.

ЗМІСТ

ВСТУП……... 7
РОЗДІЛ 1. МІКРОБНА ПРИРОДА КОЛАГЕНОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ……..…….....…...9
РОЗДІЛ 2. ОПТИМІЗАЦІЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ ОТРИМАННЯ МІКРОБНИХ КОЛАГЕНАЗ……...…..... 16
2.1. Конструювання рекомбінантних штамів-продуцентів колагенази…..... 16
2.2. Технології культивування мікроорганізмів і вдосконалення живильних середовищ…….. 19
2.3. Виділення та очищення мікробної колагенази…….....… 23
РОЗДІЛ 3. ІННОВАЦІЙНІ НАПРЯМКИ У ВИКОРИСТАННІ КОЛАГЕНОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ У МЕДИЦИНІ……...… 27
3.1. Наукові докази терапевтичного застосування колагенази……...… 27
3.2. Перспективи використання желатиназ у медицині……..... 34
РОЗДІЛ 4. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ…...…… 35
4.1. Характеристика біотехнологічного продукту…….35
4.2. Вибір форми випуску ЛЗ……...….... 37
4.3. Розрахунок потреби субстанції для випуску ЛЗ……...….. 38
4.3.1 Перелік виробників кінцевого продукту і виробників (постачальників) субстанції……38
4.3.2 Розрахунок річної потужності виробництва субстанції, об’єму ферментера та кількості виробничих циклів……...…….. 39
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ СТАДІЙ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ……45
5.1. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів отримання субстанції для виробництва ЛЗ……... 45
5.1.1. Обґрунтування способу відділення культуральної рідини від біомаси……47
5.1.2 Обґрунтування способу виділення цільового продукту з супернатанту……..52
5.1.3 Обгрунтування способу попередньої очистки цільового продукту...… 57
5.1.4 Обгрунтування способу очищення цільового продукту……...59
5.1.5 Обгрунтування способу сушіння……...… 63
5.1.6. Обгрунтування вибору допоміжних робіт……...… 65
5.2. Обґрунтування вибору форми та упаковки колагенази……. 67
5.2.1 Обґрунтування форми випуску колагенази……...….... 67
5.2.2. Обґрунтування вибору первинної і вторинної упаковки ЛЗ……...…68
5.3. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях……... 68
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ……..71
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ КОЛАГЕНАЗИ…… 74

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА…… 81
8.1. Показники якості готового продукту……...81
8.1.1. Мікробіолгічний контроль……..82
8.1.2. Визначення колагеназної активності…….82
8.2. Контрольні точки виробництва колагенази……82
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ……..85

ВСТУП

На сьогоднішній день ензимотерапія є дуже перспективним напрямком лікування багатьох різних захворювань. Існує група розладів і станів, викликаних фіброзними і рубцевими процесами і пов'язаних з надмірним накопиченням колагену, який необхідно катаболізувати для нормалізації вмісту сполучної тканини. Організм людини в нормі сам синтезує спеціальні позаклітинні ферменти — матриксні металопротеази. Ці ферменти можуть розщеплювати компоненти позаклітинного матриксу і різні типи колагену і таким чином підтримувати баланс компонентів сполучної тканини.

Ферментативна терапія є дуже ефективним способом лікування таких станів, пов’язаних із колагеном. Він передбачає застосування екзогенних колагенолітичних ферментів, які катаболізують надлишок колагену в ураженій ділянці та призводять до успішного усунення захворювання (Shekhter та ін., 2019).

Протеази з колагенолітичною активністю також мають величезне значення через їх промислове, а також біологічне застосування. Мікробні колагенолітичні протеази в наші дні привертають величезну увагу через їх нижчі вимоги та вищу продуктивність (Bhagwat & Dandge, 2018).

Інші важливі галузі застосування колагеназ — медицина і біотехнологія. Так, для дезінтеграції сполучної тканини, одержання суспензії клітин або клітинних новоутворень зі збереженням життєздатності клітин необхідним є вибіркове руйнування позаклітинного матриксу без ушкодження поверхні живих клітин. Механічні засоби у цьому разі неефективні через високу стійкість матриксу порівняно з клітинами. Протеази з широкою субстратною специфічністю сильніше руйнують білкове покриття клітин, аніж матрикс, оскільки колаген практично не піддається їхній дії. Єдиним ефективно діючим засобом є високоспецифічні колагенази, які вибірково руйнують молекули

колагену і не діють на інші білки (Shekhter та ін., 2019).

Колагенази використовуються в медицині, фармацевтиці, продуктах харчування, косметиці та текстилі, а також застосовуються для дублення хутра та шкіри, щоб забезпечити рівномірне фарбування шкіри (Kanth, Venba, Madhan, Chandrababu & Sadulla, 2008). У медицині його можна використовувати для лікування опіків і виразок, для усунення шрамів, для лікування хвороби Дюпюітрена на додаток до різних типів фіброзу, наприклад цирозу печінки, для підготовки зразків для діагностики, для виробництва. пептидів з антиоксидантною та протимікробною діяльністю, і відіграють надзвичайно важливу роль в успіху хірургії трансплантації деяких конкретних органів (Wanderley та ін., 2017).

Пошуки нових мікробних колагеназ зросли з роками, і їх виробництво в даний час є однією з найбільших ферментних галузей (Abidi та ін., 2013; Graminho та ін., 2013). Розробка нових методів виробництва, включаючи пошук мікроорганізмів, альтернативних джерел субстратів, кращих умов екстракції та очищення колагенази, має велике значення, оскільки вона має широкий спектр застосування з високим біотехнологічним потенціалом.

РОЗДІЛ 1. МІКРОБНА ПРИРОДА КОЛАГЕНОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ

Мікробні колагенази (ЕС 3.4.24.7) секретуються анаеробними/аеробними патогенними та непатогенними мікроорганізмами для використання колагену як джерела поживних речовин. «Нативні» колагени стійкі до більшості звичайних протеаз завдяки своїй потрійній спіральній структурі, але легко розщеплюються в певному місці колагеназою. Проте мікробна колагеназа є унікальною і здатна гідролізувати нативний колаген у фізіологічних умовах. Вони володіють широкою субстратною специфічністю для розкладання як водонерозчинних «нативних» колагенів, так і водорозчинних денатурованих (Pal & PV, 2016). Тому мікробні «справжні» колагенази привернули велику увагу їх численні промислові, біотехнологічні, фармакологічні, медичні та харчові застосування (Fields, 2013; Lima та ін., 2015; Duarte, Correia & Esteves, 2016).

У минулому велика увага приділялася виділенню та екстракції колагеназ із тканин тварин. Останнім часом акцент зміщено на отримання мікробних колагеназ, які мають переваги в порівнянні з тваринними (Lima та ін., 2015; 2011; 2009). У промислових масштабах цей фермент отримують з патогенного мікроорганізму *Clostridium sp*. Weinberg і Randin (1932) повідомили про перші докази виробництва бактеріальної колагенази в 1932 році.

Мікробні колагенази належать до сімейства пептидаз MEROPS M9 (INTERPRO: IPR002169; PFAM: PF01752), яке включає бактеріальні металопротеїнази (передбачувано залежні від цинку) з *Vibrio* та *Clostridium* з імовірною колагенолітичною активністю. Комітет з номенклатури Міжнародного союзу біохімії та молекулярної біології (NC-IUBMB) відніс ці ендопептидази до групи ЕС 3.4.24.3 (мікробні колагенази) підкласу металоендопептидаз (ЕС 3.4.24). Основним джерелом знань про бактеріальні

колагенази були численні дослідження ферментів, що виробляються *Clostridium histolyticum*. Після глибокої фізико-хімічної та біохімічної характеристики шести білків клостридіальні колагенази вперше були класифіковані на два класи. Розрізнення між класом I і класом II проводилося на основі кінетичних і структурних характеристик.

Колагенази класу I мають високу активність проти колагену та помірно активні проти FALGPA, синтетичного пептиду, який використовується для кінетичних досліджень колагеназ, який не гідролізується іншими протеїназами, такими як трипсин, термолізин або еластаза. Ферменти класу II виявляють помірну активність щодо колагену, але високу активність щодо синтетичних пептидів (Duarte та ін., 2014).

Мікробне виробництво завжди перевершує виробництво тварин або рослинних клітин через їх обмежені потреби та вищу продуктивність (Jhample та ін. 2015). До цього часу колагенази були очищені та охарактеризовані з дуже небагатьох мікробних видів. Однак є можливість для багатьох інших мікробних колагеназ, які ще не очищені або охарактеризовані на структурному рівні (Pal & Suresh 2016).

C. perfringens і *C. tetani* є іншими клостридіями, що продукують колагеназу. Вони широко поширені в природі, зокрема в ґрунті та воді, забрудненій фекаліями. Вони також живуть у шлунково-кишковому тракті людини та тварин (Matsushita та ін., 1994). Повідомлялося, що патогенні штами, такі як *C. histolyticum* і *C. tetani*, використовують колагеназу для сприяння інвазії господаря, колонізації та дифузії токсинів під час анаеробних інфекцій 2. Натомість однією з інших добре вивчених бактеріальних колагеназ є колагеназа *Vibrio alginolyticus*. Виявлено, що колагеназна активність колагенази *V. alginolyticus* вища, ніж будь-якої іншої бактеріальної колагенази (Rawlings, Barrett & Bateman, 2012; Park та ін., 2015).

Різні дослідницькі групи повідомляють про кілька методів скринінгу мікроорганізмів, що продукують колагеназу. Проте в літературі, існує велика наукова суперечка щодо відповідного та чітко визначеного скринінгу

мікроорганізмів, що продукують колагеназу. Це протиріччя було виявлено через подібні ферменти, такі як колагенолітична протеаза, желатиназа та інші протеази (Bernal та ін., 2021; Preet Kaur & Azmi, 2013; Park та ін., 2015; Oliveira та ін., 2017).

У дослідженні Gautam та Azmi, (2017) було ідентифіковано та виділено 27 мікроорганізмів, що продукують колагеназу, із зразків ґрунту/стічних вод рибного ринку та боєнь. Зразок CS-20 виявлено найбільш ефективним мікроорганізмом-продуцентом колагенази. Цей зразок був ідентифікований з роду *Pseudomonas* і виділений як вид *Pseudomonas*. Такі параметри, як температура, субстрат, pH, період інкубації та відсоток інокулята, також були оптимізовані для скринінгу штаму гіперпродуцента з максимальною активністю колагенази. Ізолят CS-20 був здатний гідролізувати інші білкові субстрати, такі як желатин і азокол. Таким чином, ізолят CS-20 є високоефективним штамом для продукції колагенази.

Мікроводорості є не дуже помітним джерелом ферментів, але є надзвичайно комерційно привабливими формами життя завдяки фотосинтетичному росту. Проте в літературі немає звітів про колагенази водоростей, але робота Wanderley та ін. (2020) є першою доповіддю про виробництво, очищення та характеристику колагенолітичних ферментів Chlorella *vulgaris*, яку культивували в автотрофних і міксотрофних умовах, а біомасу використовували для отримання клітинного екстракту. Автотрофний екстракт виявляв вищу колагенолітичну активність і був використаний для експериментального дизайну ATPS.

Серед мікроорганізмів, які виробляють колагенолітичні ферменти, нитчасті гриби мають великі переваги, такі як висока продуктивність та низька вартість виробництва, швидкий розвиток (Lima та ін., 2011). Оскільки грибкові протеази здатні гідролізувати багато інших білків, окрім колагену, попит на колагенази з грибів із відповідними характеристиками, а саме високою специфічністю, є дуже важливим напрямком досліджень (Wanderley та ін., 2017).

Позаклітинна продукція грибкових колагеназ особливо полегшує її відновлення після закінчення ферментації [19]. Дослідження повідомляють про біосинтез колагеназ грибами, що належать до різних родів, таких як *Aspergillus, Cladosporium, Alternaria, Penicillium* (Lima та ін., 2011; Siqueira та ін., 2014; Rosso та ін., 2012), *Candida* (Lima та ін., 2009), *Microsporum* (Viani та ін., 2007) і *Rhizoctonia* (Hamdy, 2008). Види роду *Penicillium* мають вищий біотехнологічний потенціал порівняно з іншими наведеними родами, як щодо виробництва протеаз, так і інших ферментів, оскільки вони мають здатність до росту в різних умовах культивування, використовуючи широкий спектр субстратів як поживні речовини (Haq та ін., 2004).

Також менш дослідженою групою колагенолітичних ферментів є желатиназа, яка демонструє здатність розщеплювати денатурований колаген, зокрема желатин. Її біохімічні властивості та механізми дії залишаються предметом активних досліджень, оскільки ці ферменти можуть мати значний потенціал для застосування в медицині, косметології та харчовій промисловості.

Повідомлялося про низку бактерій, здатних виробляти желатиназу. *Pseudomonas aeruginosa* володіє генами, що продукують желатиназу, які вона використовує для посилення вірулентності (Balan та ін., 2012). Інші добре відомі бактерії, що продукують желатиназу, включають *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* і деякі види *Vibrio*. Серед цих організмів лише *Bacillus subtilis* є непатогенним видом. Мікробні біотехнологи невпинно досліджували непатогенні види бактерій з потенціалом для великомасштабного виробництва желатинази. Основні цілі цього дослідження полягали у виборі штаму бактерії, про який не повідомлялося про випадки вірулентності, але з потенціалом для комерційного виробництва желатинази та демонстрації дуже простих методів вивчення її кінетики для полегшення застосування (Batroukha, Nour El Dein, Abou-Dobara & El-Sayed, 2022).

У дослідженні Mohseni, Moghadam, Dabirmanesh & Khajeh, (2016), активний повнорозмірний рекомбінантний людський MMP-9 (амінокислотні залишки 107–707) був клонований у pET21a, трансформований та експресований

у *E.coli* BL-21(DE3). Оскільки білок експресувався у формі тілець включення, тому для процесу рефолдингу було застосовано два різні методи (розведення та градієнт сечовини). Порівнювали активність і структуру ферменту в обох методах. Для характеристики конформаційних змін ферменту використовували вимірювання внутрішньої інтенсивності флуоресценції та CD в дальньому ультрафіолетовому діапазоні.

Bacillus amyloliquefaciens H11 доведено як потенційний продуцент позаклітинної протеази зі здатністю гідролізувати желатин. Умови культивування для посиленого виробництва желатинолітичного ферменту з нещодавно виділеного *B. amyloliquefaciens* H11 були досліджені з використанням дизайну Плакетта–Бермана та методології поверхні відгуку. Збільшення швидкості перемішування та концентрації риб'ячого желатину помітно збільшувало вироблення желатинолітичного ферменту. Концентрація желатину та час культивування показали значну взаємодію, і обидві змінні відіграли важливу роль у виробництві ферменту (Sai-Ut та ін., 2014).

У дослідженні (Batroukha, Nour El Dein, Abou-Dobara & El-Sayed, 2022), продуцент ферменту желатинази *Lentzea sp*. був виділений із ґрунту (ризосфери пальмового дерева). *Lentzea sp*. штам як рідкісна актинобактерія вважається одним із нових видів, що продукують желатиназу. Дослідження вивчили потенційні можливості вибраного штаму для виробництва позаклітинного ферменту желатинази шляхом зануреної ферментації базального середовища з комбінацією желатину та пептону як джерел азоту.

Li та ін., (2022) охарактеризували нову желатиназу S8, Aa2_1884, з морської бактерії *Flocculibacter collagenilyticus* SM1988, і оцінили її потенційне застосування для отримання олігопептидів колагену з колагену бичачих кісток. Aa2_1884 є мультимодульною S8 пептидазою з відмінною від інших зареєстрованих пептидаз доменною архітектурою. Рекомбінантний Aa2_1884 із надмірною експресією в *Escherichia coli* продемонстрував високу активність щодо желатину та денатурованих колагенів, але не мав активності щодо природних колагенів, що вказує на те, що Aa2_1884 є желатиназою. Отриманий

гідролізат містив 97,8% пептидів, у яких пептиди з молекулярною масою менше 1000 Да і 500 Да становили 55,1% і 39,5% відповідно, що вказує на те, що гідролізат був багатий олігопептидами. Ці результати вказують на те, що Aa2_1884, ймовірно, має багатообіцяюче потенційне застосування.

Також існує дослідження (Yuivar, Alcaino, Cifuentes & Baeza, 2019), яке є першим звітом про позаклітинну желатиназну активність дріжджів *Metschnikowia sp., L. fragarium* і *Mrakia sp.,* отриману шляхом аналізу зразків позаклітинного білка за допомогою колориметричного методу. Властивості желатинази *Mrakia sp*. зробити його привабливим для подальших досліджень для оцінки застосування та виробництва цього ферменту у великих масштабах. З огляду на прикладні та продуктивні цілі, використання мікроорганізмів як джерел ферментів має такі переваги, як швидкий ріст, зростання в недорогих середовищах і менші вимоги до місця для їх культивування у великих масштабах. Крім того, желатиназа *Mrakia sp*. зберігає принаймні 40% своєї найвищої активності в діапазоні температур від 35°C до 40°C і pH від 6,5 до 9,0, що є перевагою для використання в різних процесах або в процесі, в якому ці параметри суттєво змінюються.

Вчені Tanaka та ін., (2018), в своєму досліджені показали, що C-кінцевий сегмент, включаючи домен PPC від колагенази *G. hollisae* 74 кДа, є новим CBD, який зв'язується з колагеном, розпізнаючи його потрійну спіральну конформацію. Доказом того, що C-кінцевий сегмент розпізнає потрійну спіральну конформацію колагену для його зв'язування, є те, що C-кінцевий сегмент зв'язується з природним колагеном, але не з денатурованим колагеном (желатином), оскільки потрійна спіральна конформація колагену існує в першому, але не в останньому. Докази того, що C-кінцевий сегмент колагенази *G. hollisae* є новим CBD, полягає в тому, що C-кінцевий сегмент відрізняється від будь-якого з трьох CBD *H. histolytica* первинною структурою, а три CBD *H. histolytica* є єдиними ті, які були виявлені досі в бактеріальній колагеназі. Що стосується первинної структури, то вони виявили, що ідентичність послідовності

між С-кінцевим сегментом і трьома CBD з *H. histolytica* менше половини ідентичності послідовності між трьома CBD з *H. histolytica.*

Крім того, це дослідження продемонструвало, що С-кінцевий сегмент у колагеназі *G. hollisae* вагою 74 кДа сприяє активності каталітичного модуля в деградації колагенів, особливо коли вони мають потрійну спіральну конформацію. Також це дослідження показало, що ідентифікація нового CBD з колагенази *G. hollisae* має стимулювати фундаментальні дослідження колагеназ M9A, включаючи з'ясування їхнього розпізнавання колагену та способу їх зв'язування з колагеном, що має потрійну спіральну конформацію. Аналіз вирівнювання послідовностей виявив, що деякі колагенази *Vibrio* схожі не лише за первинною структурою, але також за кількістю та положенням залишків цистеїну до домену PPC з *G. hollisae*. Цей висновок також може сприяти як характеристикам інших типів M9A-PPC, так і їх взаємозв'язку структура-функція.

РОЗДІЛ 2. ОПТИМІЗАЦІЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ ОТРИМАННЯ МІКРОБНИХ КОЛАГЕНАЗ

2.1. Конструювання рекомбінантних штамів-продуцентів колагенази

Використання методів генної інженерії дозволяє отримати мікроорганізми, здатні ефективно синтезувати колагенази в промислових масштабах. Такий підхід спрямований на підвищення продуктивності ферменту та поліпшення його біохімічних властивостей для подальшого застосування в біотехнологіях і медицині.

Дослідники модифікували колагеназу за допомогою генної інженерії, щоб покращити її експресію, очищаючи мікробні колагенази від обраних видів бактерій і секвенуючи пов'язані гени. (Pal & Pv, 2016). Молекулярне клонування з відповідними векторами є відповідним методом для отримання колагенази, оскільки нативні колагенази можуть негативно впливати на біосинтез через недостатню стійкість і різні ізоферментні конфігурації. (Song та ін., 2021). Рекомбінантна колагеназа конструюється за допомогою таких тегів, як His та MBP. MBP tag покращує розчинність цільового білка, сприяючи правильному згортанню та призводить до подальшого збільшення врожаю (Dutta & Bose, 2022). Системи експресії, такі як *E. coli* та *Brevibacillus,* використовуються для успішної експресії гена колагенази (Zhu та ін., 2022; Teramura та ін., 2011).

Повідомлялося про експресію передбачуваної колагенази *Burkholderia pseudomallei* в *Escherichia coli* (Burtnick, Brett & DeShazer, 2014). Вони клонували ген колагенази, і білок був експресований як злиття глутатіон-S-трансферази (GST) і очищений. Проте бракує інформації про склад домену та особливості колагенази *B. pseudomallei*. Однак активність колагенази з пептидом FALGPA була слабкою, але це могло бути пов'язано зі злиттям глутатіонтрансферази (Duarte та ін., 2014). Було виявлено високу желатиназну активність, що змусило

авторів постулювати, що *B. pseudomallei* експресує активну колагеназу/желатиназу, але клас не був можливим.

Каталітичний домен колагенази G з *C. histolyticum* був клонований (Eckhard, Schönauer, Nüss & Brandstetter, 2011) і експресований у *E. coli* та очищений за допомогою методів афінної та ексклюзивної колонкової хроматографії.

Ducka та ін.(2009) встановили систему експресії *E. coli* для ряду конструкцій колагенази T з *C. tetani* та колагенази G і H з *C. histolyticum* (Ohbayashi та ін., 2013). Колагенази або гени, що кодують колагенази, були ідентифіковані у багатьох видів *Clostridium: C. histolyticum, C. perfringens, C. botulinum, C. tetani* та *C. difficile* (Duarte та ін., 2014; Matsushita та ін., 1994). Клонування генів колагенази G і H спрощено. розвиток систем експресії мікробної колагенази. Система експресії *C. perfringens* полегшила проблеми трансляції та експресувала *colH* (Ohbayashi та ін, 2012).

Matsushita та ін. (1994) клонували та секвенували ген *col*, що кодує колагеназу 120 кДа з *C. perfringens*. Вони також описали клонування та секвенування гена *colH*, що кодує колагеназу 116 кДа з *C. histolyticum*.

Вчені Revankar та ін. (2024) ідентифікували ген колагенази зі штаму Z1 *Bacillus siamensis* шляхом клонування, експресії та афінної очистки. Молекулярна маса очищеної колагенази становила ~ 89,4 кДа. Рекомбінантна колагеназа демонструвала стабільність з численними біохімічними факторами, такими як оптимальний pH і температура, іони металів, термодинамічні властивості, каталітична ефективність тощо, і володіє лужною термостабільністю. Ідентичність колагенази перевіряли за допомогою MALDI-TOF-MS, тоді як структурне з'ясування за допомогою CD,[1] H ЯМР і термостабільності за допомогою TGA. Структурні та функціональні характеристики, такі як моделювання гомології, ідентифікація сімейного домену, фізико-хімічні властивості та філогенетичний аналіз гена колагенази, проводилися за допомогою численних обчислювальних інструментів. Було використано молекулярне стикування колагенази з чотирма різними

субстратами за допомогою двох програм для стикування (PyRx і Autodock). Комплекс з найвищим показником стикування –12,7 ккал/моль, що включає змодельовану колагеназу та субстрат APHCP, аналізували для молекулярної динаміки та моделювання протягом 200 нс.

У роботі Zhu та ін. (2022), вчені дослідили, що ген *col*, що кодує колагеназу, успішно експресувався в *B. subtilis* WB600 під вектором pP43NMK. Послідовність колагенази містила відкриту рамку зчитування 936 bp, яка кодує білок із 312 амінокислотних залишків із передбаченою молекулярною масою 35,4 кДа. Рекомбінантний фермент очищали сульфатом амонію, ультрафільтрацією та нікелевою колонкою з колагеназною активністю 9405,54 ОД/мг.

Для створення колагенази *G.hollisae*, корисної як продукт колагенази, вчені Tanaka та ін. (2022), розробили рекомбінантну колагеназу 62 кДа, що складається лише з каталітичного домену, який демонструє високу ефективність виробництва. Вони продемонстрували, що ця рекомбінантна колагеназа є стабільною та активною у фізіологічних умовах. Крім того, вона має вищу специфічну активність проти колагену та розщеплює більшу кількість колагенів, ніж стандартний продукт колагенази з *C. histolyticum*. Крім того, вона дисоціювала мишачу підшлункову залозу шляхом перетравлення колагенів у підшлунковій залозі залежно від дози, і ця дисоціація сприяла виділенню панкреатичних острівців з масою та кількістю, порівнянними з тими, що були виділені за допомогою стандартної колагенази з *C. histolyticum*. Імплантація цих ізольованих острівців п'яти діабетичним мишам призвела до нормалізації концентрації глюкози в крові всіх реципієнтів. Ці знахідки свідчать про те, що рекомбінантну колагеназу 62 кДа з *G. hollisae* можна використовувати як продукт колагенази для ізоляції первинних клітин.

У дослідженні Xiao та ін. (2022), дві колагенази ColG (запис UniProt: Q9X721) і ColH (запис UniProt: Q46085) з *H. histolytica*, були успішно секретовані *S. cerevisiae*. Штам дріжджів *S. cerevisiae* B184M (Huang та ін., 2015), УФ-мутант із підвищеною секрецією білка, був обраний як штам-господар для

гетерологічної експресії ColG і ColH. Для управління секрецією використовувавали широко використовуваний у дріжджах сигнальний пептид, лідер α-фактора. По-перше, кодон-оптимізовані гени *colG* і *colH*, злиті з сигнальними лідерними послідовностями, були вставлені у вектор CPOTud, що призвело до pCP_G01 і pCP_H01, відповідно. І pCP_G01, і pCP_H01 були трансформовані в штам B184M, і були отримані штами BG01 і BH01.

Добавки Ca^{2+} та Zn^{2+} були вирішальними для виробництва колагенази високого рівня. Виробництво колагенази було збільшено шляхом оптимізації експресійних касет. Експресія колагенази накладала на клітини метаболічний тягар і кофакторні порушення. Процеси виробництва колагеназ були різними; Виробництво ColG досягло плато раніше, тоді як виробництво ColH мало фазу затримки. Це дало підказки для вибору потенційних цілей для створення штамів дріжджів для ефективного виробництва колагенази в майбутньому. Рекомбінантні колагенази розщеплювали колаген, а синергетичний ефект колагеназ сприяв ефективному перетравленню колагену. Наскільки нам відомо, це перший раз, коли було продемонстровано синергічний ефект розпаду колагену рекомбінантними колагеназами. Експресія колагенази в секретованій формі може спростити подальшу обробку порівняно з внутрішньоклітинною експресією. Враховуючи статус GRAS *S. cerevisiae*, надосадову рідину, що містить колагенази, можливо, можна використовувати безпосередньо як неочищений розчин ферменту та легко адаптувати до обробки колагенового матеріалу.

2.2. Технології культивування мікроорганізмів і вдосконалення живильних середовищ

Розробка недорогих складів промислових середовищ для виробництва мікробної колагенази може відігравати значну роль у вартості продукту, концентрації, виході та продуктивності.

Склад середовища є найважливішим аспектом, який слід враховувати при вирощуванні будь-якого мікроорганізму. Поживне середовище має містити всі необхідні мікроорганізму поживні речовини. На виробництво ферменту

колагенази впливають різноманітні фізичні та хімічні фактори, такі як концентрація інокулята, час інкубації, pH, температура, джерела вуглецю, азоту та мінералів тощо. Однак склад середовища культивування (джерела вуглецю та азоту) відіграють значну роль у виробленні ферментів. Тому оптимізація співвідношення витрат і вигод таких процесів є головною проблемою. Вартість виробництва колагенази є основною перешкодою для успішного промислового застосування. Недороге середовище можна використовувати для економічно доцільного промислового виробництва колагенази з більшим виходом.

У цій статті (Blieva та ін., 2019) було досліджено вплив різних джерел вуглецю та азоту на виробництво колагенази грибковою асоціацією *Aspergillus awamori* 16 та *Aspergillus awamori* 22. Максимальну активність колагенази (8,1 Од/мл) виявили в середовищах з 2% сахарози як джерело вуглецю та 1% пептону як джерело азоту. Підбір джерел вуглецю та азоту для *A. awamori* 22 та *A. awamori* 16 дозволив збільшити позаклітинний біосинтез колагенази з 6,8 Од/мл до 8,1 Од/мл.

Дослідження Ferreira, та ін. (2016) демонструє, що *Aspergillus sp*. UCP1276 ефективно розщеплює залишки курячого пір'я, як єдине джерело вуглецю та азоту. Очищена колагеназа продемонструвала збільшення питомої активності в 2,09 рази та вихід 22,85%. Фермент представляв собою мономерний білок з молекулярною масою 28,7 кДа, визначеною за допомогою SDS–PAGE та системи АКТА. Потім вчені оцінили потенціал ферменту щодо деградації колагенів типу I та V для виробництва пептидів з протигрибковою активністю. Результати показали, що розщеплення колагену типу V дає більш ефективні пептиди, ніж колаген типу I, пригнічуючи ріст *Aspergillus terreus*, *Aspergillus japonicas* і *Aspergillus parasiticus*. Обидві групи пептидів (тип I і тип V) були ідентифіковані за допомогою SDS-PAGE. Підсумовуючи, термостабільна колагеназа, яку очистили в цьому дослідженні, має різні потенційно корисні застосування в галузі біохімії, біотехнології та біомедичних наук.

Вчені Al-Bedak та ін. (2023), також дослідили синтез колагенази та кератинази мікроорганізмом *Didymella keratinophila,* шляхом гідролізу

нативного курячого пір'я під час зануреної ферментації. Після 10 днів бродіння при 30 °C, pH 9 з використанням нітрату натрію як джерела азоту спричинив найвищу активність кератинази 8780 ± 620 ОД/мл/хв, тоді як pH 6 і екстракт яловичини спричинили максимальну активність колагенази 11 230 ± 1290 ОД. /мл/хв. Частково очищений фермент кератиназа найкраще працював при pH 7,0 і 45 °C, демонструючи питому активність 44 903 ± 1555 Од/мг білка. Активність частково очищеного ферменту колагенази була чудовою при pH 6,0 при 35 °C, генеруючи 15753 ± 110 Од/мг специфічної активності ферменту. Найбільш ефективними інгібіторами кератиназ і колагенази були Mn^{2+} і K^{+} відповідно.

Різні типи колагенових добавок (природний колаген, желатин/гідролізат колагену тощо) використовувалися в культуральних середовищах для виробництва позаклітинних ферментів колагенази.

Вчений Abdel-Fattah (2013) оптимізував виробництво колагенази з морської *Nocardiopsis dassonvillei* NRC2aza з використанням відходів хітину. Максимальну активність колагенази (240 Од/мл) було отримано після 6 днів інкубації у струшуваних рідких культурах, коли цілі хітинові відходи (відходи креветок і крабів) використовували як єдине джерело азоту та вуглецю. Показано, що ізолят NRC2aza *N. dassonvillei* продукує значну кількість колагенази, що досягає 1872 ОД/г, під час ферментації в твердому стані з використанням суміші 10 г відходів хітину та 2 г пера. Оптимальним значенням pH і температури було 8 і 55 °C відповідно, а фермент був стабільним в діапазоні pH 6–8. Колагеназа демонструвала термостабільність протягом 60 хв при 50°C.

У дослідженні Bhagwat, Bhise, Bhuimbar & Dandge (2018) нові та дешеві джерела, такі як риб'яча луска та патока, використовувалися для виробництва колагенолітичної протеази. Статистична оптимізація різних параметрів продукції колагенолітичної протеази штамом SUK *Bacillus cereus* була проведена за допомогою методології поверхні відповіді (RSM). Трьома найважливішими компонентами середовища, визначеними Плакеттом-Берманом (PB), були риб'яча луска, патока та час інкубації, які були додатково оптимізовані за допомогою центрального композитного дизайну (CCD).

Середовище, що містить риб'ячу луску 9,38 г/л, мелясу 2,42 г/л і час інкубації 67,34 год, було визнано оптимальним для максимального виробництва колагенолітичної протеази.

Штам *B. cereus* SUK продемонстрував численні ознаки, що сприяють росту, тоді як деградовані гідролізати риб'ячої луски (FSH) мали антимікробні властивості, а також здатність стимулювати ріст. Колагенолітична ефективність цього ізоляту може бути використана в екологічно чистому процесі біоконверсії рибних відходів, що представляє собою альтернативний спосіб управління відходами, який можна використовувати для виробництва різних продуктів із доданою вартістю, таких як колагенолітична протеаза, мікробна біомаса, амінокислоти, білкові гідролізати та колагенові пептиди.

У роботі Pequeno та ін. (2018) було виділено та ідентифіковано штам MBL13, здатний синтезувати колагенази, використовуючи кістковий желатин як джерело вуглецю та азоту. За морфологічними характеристиками, фізіологічними та біохімічними характеристиками, у поєднанні з аналізом послідовності 16S рДНК, штам ідентифіковано як *Bacillus cereus*, який продемонстрував найвищу здатність у продукуванні колагенази. Результати показали, що сахароза, кістковий желатин і Ca^{2+} були оптимальними джерелами вуглецю, азоту та іонів металу для *B. cereus* MBL13. За методологією поверхні відповіді (RSM) оптимальні умови бродіння становили температура 33,8 °C, час бродіння 49,5 год, концентрація інокулята 45,2 мг/л, об'єм середовища 27,3 мл і початковий pH 6,8 з максимальною активністю колагенази 50,03 Од/мл. З культурального супернатанту була очищена нова колагеназа, і її молекулярна маса була оцінена за допомогою SDS-PAGE як приблизно 52,0 кДа. Аналіз за допомогою скануючої електронної мікроскопії показав, що очищена колагеназа може ефективно руйнувати колаген бичачих кісток.

Групою вчених (Silva та ін., 2022) було вперше повідомлено про виробництво колагенази штамом *Trichosporon* sp., виділеного з пилку амазонської бджоли (*Melipona seminigra seminigra*). Трихоспоронові дріжджі широко використовуються для виробництва ліпідів, ліпаз і аспарагінової

пептидази, але попередніх досліджень виробництва колагенази не проводилося. Ця робота була спрямована на вибір найкращих штамів *Amazonian Trichosporon*, що продукують колагеназу. Крім того, для оптимізації виробництва та пошуку найкращих умов для гідролізу бичачого колагену I типу було застосовано 2^3-повний факторний дизайн (FFD) і 2^{2-} центральний композитний дизайн у поєднанні з методологією поверхні реакції. Більшість досліджуваних штамів мали певну колагенолітичну активність, але відібраний досяг найвищого значення (44,02 Од) та концентрації біомаси 2,31 г/л. Найкращими умовами виробництва колагенази були 160 об/хв перемішування, pH 5,5 і концентрація субстрату 4,0 г/л. Перший експериментальний план показав, що концентрація субстрату була єдиним статистично значущим фактором як для концентрації біомаси, так і для активності колагенази, тоді як останній показав одночасний вплив концентрації субстрату та pH на колагенолітичну активність, яка досягала піку при pH 5,5–6,4 і концентрації субстрату 3,0–3,4 г/л. Зрештою, для оптимізації умов гідролізу колагену було використано додатковий 2^3-FFD, а pH 6, 25 °C і концентрація субстрату 7,5 (г/л) забезпечили найвищий ступінь гідролізу. Це перше дослідження, яке описує оптимізовані умови виробництва колагенази штамами *Trichosporon*.

2.3. Виділення та очищення мікробної колагенази

Повідомлялося про низку різних процесів екстракції з використанням різних буферних систем, але всі вони включають використання осадження та центрифугування для виділення активного білка. Більшість методів проводять при фізіологічному pH (7,4-7,6) і низькій температурі (<4°C), щоб запобігти денатурації ферменту (Daboor, Budge, Ghaly, Brooks & Dave, 2010).

Для виділення колагенази з клітин було використано низку дуже подібних процедур за допомогою буферів трис-HCl у вузькому діапазоні pH 7,4-7,6 з низькими концентраціями $CaCl_2$ (5-20 мМ), доданими до буфера при температури < 4°C (Sakamoto та ін., 1972; McCroskery та ін., 1975). Усі методи включають стадію ультрацентрифугування (>20000g) з подальшим

фракціонуванням сульфатом амонію (з концентраціями в межах 25-80%) і виділенням осаду.

Інші дослідники модифікували цю базову процедуру з ряду причин. Ohyama і Hashimoto (1977) додали тіоціанат натрію до неочищеного екстракту після центрифугування, щоб служити активатором колагенази. McCroskery, Richards і Harris (1975) додали азид натрію для придушення росту мікробів.

Delaissè та ін. (1985) і Gillet та ін. (1977) додали високі концентрації хлориду натрію (до одного М) під час екстракції, щоб стимулювати дисоціацію колагенази з нерозчинного колагену. Ohyama і Hashimoto (1977) включили повторювані цикли заморожування-розморожування, щоб порушити клітинні стінки та зробити фермент більш доступним для буфера. Однак у дуже небагатьох звітах описується врожайність на кожному етапі, тому важко отримати доступ до ефективності екстракції з різними методами.

Sivakumar та ін. (1999) екстрагували колаганазу з гепатопанкреасу зеленого краба шляхом гомогенізації тканини в натрій-бікарбонатному буфері (pH 8,3), що містить хлорид кальцію, а потім перемішували протягом 36 годин для екстракції ферменту. Потім колагеназу виділяли шляхом осадження в холодному ацетоні. У промислових масштабах використання органічного розчинника навряд чи буде практичним через ризик пожежі та вибуху. Тривалий період перемішування призведе до збільшення шансів росту мікробів, а додавання антимікробного препарату збільшить витрати.

Очищення мікробної колагенази було ускладнено через наявність багатьох форм та інших протеаз із подібними фізичними та хімічними характеристиками (Matsushita та ін., 1994). Очищена форма колагенази необхідна для вивчення біохімічних властивостей, структури ферменту, каталітичного механізму, структурно-функціональних зв’язків та їх біотехнологічного та медичного застосування.

Описано кілька методів очищення бактеріальних колагеназ (Ohbayashi та ін., 2012; Abdel-Fattah, 2013; Daboor, Budge, Ghaly, Brooks & Dave, 2010). Під час очищення колагенази необхідно пам’ятати про наявність неспецифічних протеаз

і важливість Ca^{+2} та інших кофакторів, які можуть впливати на активність ферменту. Колагеназу з *C. histolyticum* зазвичай очищають шляхом збору надосадової рідини з об'ємів 8–10 літрів бактерій, які росли протягом 48 годин при 25°C. Сульфат амонію додають до надосадової рідини, як правило, у концентраціях, щоб отримати від 60 до 90% насичення. Розчин залишають на ніч при 4°C, а осад білка, який збирають фільтруванням або центрифугуванням, розчиняють у буфері та діалізують при 4°C до звільнення від сульфату амонію. Діалізат ліофілізується і вважається неочищеним ферментом. Цей ферментний препарат містить значні домішки, в тому числі неспецифічні протеази. Ці неспецифічні протеази можна відокремити від колагенази за допомогою колонкової хроматографії неочищеного ферменту на колонках для молекулярного сортування (Sephadex G-50 або G-200) та/або іонообмінних колонках (DEAE Sephadex A-50). У той час як відсоток насичення сульфатом амонію та тип колонкової хоматографії можуть відрізнятися залежно від різних описаних процедур очищення колагенази *C. histolyticum*, етапи очищення в основному однакові.

Bond і Van Wart (1984) детально описали метод очищення клостридіальних колагеназ до гомогенності за допомогою хроматографії на гідроксилапатиті, Sephacryl S-200 і L-arginine-Affi-Gel 202. Починаючи з сирих і частково очищених препаратів клостридіальної колагенази від комерційних постачальників, вони змогли додатково очистити колагенази приблизно в п'ять разів і видалити забруднюючу неспецифічну протеазну активність.

Makinen і Makinen (1987) повідомив про детальну процедуру очищення колагенази *B. cereus*, починаючи з культури клітин. Їх процедура передбачала фільтрування 196 літрів *B. cereus* через 4 години росту через систему ультрафільтрації та концентрування фільтрату до 1280 мл за допомогою тієї ж системи ультрафільтрації, використовуючи мембрану з відсіканням 30 000 МВт. Потім матеріал додатково концентрували шляхом осадження 80% сульфату амонію. Обложений білок відокремлювали колонковою хроматографією на сефадексі G-200, а елюйований фермент концентрували за допомогою фільтра

Amicon з відсіканням 10 000 МВт. Потім фермент очищали до гомогенності за допомогою швидкої білкової рідинної хроматографії (FPLC) за допомогою системи Pharmacia FPLC, обладнаної гелевою колонкою Superose 12 HR10/30, колонкою з оберненою фазою PepRP HR5/5 та аніоном Mono Q HR5/5. обмінна колонка. Очищений фермент мав питому активність у 2000 разів вищу, ніж культуральний фільтрат. У літературі описано процедури очищення колагеназ від інших бактерій (Endo, Murakawa, Shimizu & Shiraishi, 1987).

РОЗДІЛ 3. ІННОВАЦІЙНІ НАПРЯМКИ У ВИКОРИСТАННІ КОЛАГЕНОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ У МЕДИЦИНІ

3.1. Наукові докази терапевтичного застосування колагенази

У медичних дослідженнях колагенолітичні ферменти використовуються для поділу клітин, їх виділення з тканин і подальшого культивування стовбурових клітин фібробластів легенів, клітин печінки, клітин надниркових залоз, клітин острівців підшлункової залози тощо (Tamagno, Vigolo, Olivieri, Martini & De Carlo, 2014; Kegel та ін., 2016). Цього можна досягти шляхом звільнення клітини від позаклітинного матриксу і від колагенових волокон. При цьому клітини залишаються недоторканими.

Колагеназа є унікальним ферментом, який використовується для лікування певних захворювань, і надмірна агрегація колагену може спричинити порушення в етіології органел. Колаген є основним білком позаклітинних ниткоподібних тканин, таких як сухожилля, шкіра, хрящі та кровоносні судини, а також органічного компонента зубів, кісток і рогівки. Нещодавно було виявлено два типи колагенази.

Колагенази частіше використовуються для поділу клітин тканин у медичних дослідженнях. Ці ферменти успішно застосовуються для видалення та переміщення клітин інсулінової залози (для хворих на діабет) (Maimets, Bron, de Haan, van Os & Coppes, 2015). За допомогою колагеназ можна також виділити непошкоджені клітини паренхіми печінки, жирові клітини та надниркові залози (Tuohetahuntila та ін., 2015). Після виділення ці клітини можна використовувати для вирощування клітин (Huch та ін., 2015). Колагеназу також застосовували в техніці G-смуги для вивчення хромосом людини. Сьогодні колагеназа використовується як засіб лікування і, здається, здатна замінити деякі інвазивні методи лікування захворювань, при яких надмірне відкладення колагену викликає порушення деяких фізіологічних функцій систем організму (табл. 3.1)

Таблиця 3.1

Препарати на основі колагенази, які використовуються для лікування захворювань, пов'язаних із колагеном

Хвороба	**Клінічний ефект**	**Склад патологічних тканин**	**pH в ураженому місці**	**Колагенази, які вже використовуються в біомедицині (діапазон pH)**		
				Колагеназа *Clostridium histloliticum* (pH 6,3-8,8)	**Колагенази водних організмів (pH 7,0-8,0)**	**Рослинні колагенази (оптимальний pH: папаїн 3,0-12,0 і бромелайн 5,5-8,5 і фіцин 5,0-7,5)**
Рани та опіки	Ферментативна обробка, лізис некротичної тканини, прискорене загоєння	Колаген I і III	5.4-8.5	Іруксол, Колагеназа, Сантил, Солосіт, Новуксол	Колагеназа СС 250 U , Поліколлагеназа-К, Колладіосорб, Морікрол, Ферменкол	Дебрідайс, Панафіл, Нексобрід
Келоїдний рубець	Розм'якшення, інволюція рубцевої тканини	Колаген I, III і IV	6.0-7.2	Коллалізин	Колагеназа СС 250 U , Поліколлагеназа-К, Колладіосорб, Морікрол, Ферменкол	-
Хвороба Пейроні	Поліпшення деформації	Колаген I і III	7.2	XIAFLE, Хіарех	-	-
Контрактура Дюпюітрена	Усунення болю та свербіння, інволюція фіброзної тканини	Колаген I і III	7.2	XIAFLE, Хіарех	-	Нексобрід
Міома матки	Зменшення обсягу	Колаген I, III і IV	7.0-7.5	Розчин колагенази *Clostridium histloliticum*	-	-
Глаукома (стриктура слізного шляху)	Розширення просвіту слізного шляху	Колаген I і III	7.5	Коллалізин	Колагеназа СС 250 ОД	-
Рубці на рогівці, сітківці та шкірі повік	Інволюція рубцевої тканини	Колаген I, III і IV	7.2	Коллалізин	-	-
Стриктура уретри	Розширення просвіту	Колаген I і III	7.2	XIAFLE, Хіарех	Колагеназа СС 250 ОД	-

*Закінчення таблиці 3.*1

Грижі дисків	Розщеплення грижі	Колаген I і II	7.5	Розчин колагенази *Clostridium histloliticum*	-	Розчин хімопапаїну
Фіброзний целюліт	Лізис фіброзних і жирових відкладень	Колаген I, III, IV і V	6.0-7.0	XIAFLEX, Promoitalia Proshock Shape	Колагенаса	-
Біль у сосках	Усунення болю	Колаген I і III	7.2	Розчин колагенази *Clostridium histloliticum*	-	-
Здоров'я порожнини рота	Видалення нальоту, депротеїнізація дентину, лікування пародонтиту	Колаген I, III і IV	<5.0-7.0	-	Колагеназа СС 250 ОД	Papacarie, Carie Care
Затримка відшарування плаценти	Відшарування плаценти	*НВ	6.0-7.0	Розчин колагенази *Clostridium histloliticum*	-	-

*НВ – не визначено

Хвороба Дюпюітрена— це аномальне потовщення тканини, спричинене непомірним відкладенням колагену в тканині, переважно типів I і III. При цьому розладі один або кілька пальців кисті, особливо малого, згинаються в долоню, і їх функція знижується. Хвороба, у багатьох випадках, трапляється з літніми білими чоловіками, і це, ймовірно, спадкове захворювання. Колагеназа з джерела *C. histolyticum* — новий засіб від скорочення м'язів Дюпюітрена, схвалений FDA. До виробництва *C. histolyticum* хірургічне втручання було єдиним методом лікування цього захворювання. Щоб оцінити довгострокову ефективність колагенази *C. histolyticum*, цей метод є дуже корисним для пацієнтів (Peimer та ін., 2015). Ін'єкція колагенази є більш ефективною, ніж хірургічна фасціотомія (Martin-Ferrero, 2014), має менше та м'які побічні ефекти та демонструє краще загальне зменшення контрактури Дюпюітрена, що призводить до більшої задоволеності пацієнтів (Engstrand, Krevers, Nylander & Kvist, 2014). Дослідження *in vitro* впливу клостридіальних колагеназ на канатики Дюпюітрена і на фібробластах хвороби Дюпюітрена продемонстрували, що колагенази *Clostridium* можуть ефективно перетравлювати позаклітинний матрикс тяжів хвороби Дюпюітрена, не викликаючи значної цитотоксичності або структурного пошкодження елементів неколагенової тканини. Крім того, було зазначено, що колагенази *Clostridium* контролюють клітинне поширення, прикріплення та проліферацію (Syed та ін., 2012).

Опіки є важливою проблемою охорони здоров'я у світі. Згідно з офіційною статистикою, лише через опіки щорічно гине 265 000 людей (Stokes & Johnson, 2017). Більшість смертей спричинені гарячими рідинами, парою, електричними опіками та іншими формами опіків, глобальна статистика яких недоступна. Понад 96% смертельних опіків, пов'язаних із пожежею, трапляються в країнах із низьким і середнім рівнем доходу. інакше тих, хто помирає, ще мільйони людей залишаються з інвалідністю та деформаціями на все життя, що часто призводить до стигматизації та неприйняття. На винятково від серйозних опіків, загоєння

частково-опікових ран відбувається за допомогою колагеназної мазі (Sharp та ін., 2014). Стандартне лікування обпалених тканин колагеназою вже схвалено FDA. Нещодавно дослідження показало, що мазь з колагеназою загоює опікову рану швидше, ніж стандартне лікування опіків. В одному дослідженні 78 послуг з опіками, які отримували мазь з колагеназою *C. histolyticum*, порівнювалися з 41 пацієнтом, у яких тканини навколо опікових ран були видалені хірургічним шляхом (McCallon, Weir & Lantis II, 2014). Застосування колагенази забезпечує короткочасну госпіталізацію та скорочує загальну потребу в хірургічному втручанні та переливанні крові при частково-пошарових опіках. Таким чином, колагеназу можна розглядати як перший варіант лікування для видалення рубців у немовлят, які мають опікову рану часткової товщини без інфекції (Rashaan та ін., 2014).

Глаукома є основною причиною постійної сліпоти. У 2010 році від цієї хвороби виникло приблизно 60,5 мільйонів людей, а до 2020 року їх кількість зросла приблизно на 79,6 мільйонів. Для контролю над цією хворобою широко застосовуються методи лікування, що знижують внутрішній тиск, незалежно від типу глаукоми. Ін'єкції колагенази - метод лікування глауком. Використання колагенази у виробництві препарату дозволяє лікувати внутрішньоочні рубці та фіброз, які виявляються після фільтраційної операції глаукоми, а також після імплантації набору імплантатів. Глаукома запускається, коли дренажні канали ока закриваються через порушення вироблення колагену. Майже 40% випадків сліпоти спричинені цією хворобою. Використання колагенази для лікування глаукоми було запатентовано в 2013 році (Alipour, Raz, Zakeri & Djadid, 2016).

Одним із факторів болю в попереку є агрегація колагенової тканини та зменшення відстані між шипами хребців. Дослідження показали, що ін’єкція ферментів, таких як колагеназа, може покращити ознаки грижі диска. У дослідженні Zhang та ін., 29 пацієнтів із постійним болем у попереку та сідничному нерві ввели інтрадискальну колагеназу в один аномальний дисковий

простір. Після консервативного лікування протягом 2 місяців і відпочинку протягом 2 тижнів у ліжку 6 пацієнтів (21%) отримали повне полегшення болю, потім як 12 (42%), 6 (21%) і 1 пацієнт отримали підвищене, помірне та легке полегшення болю відповідно (Zhang та ін., 2015).

Дебридман – це видалення нездорової тканини з рани для покращення загоєння. Цю процедуру, яка є життєво важливим фактором у підготовці ранового ложа, можна виконати шляхом хірургічного, хімічного, механічного або аутолітичного видалення тканини. У клінічній діяльності зазвичай використовуються різні методики для санації. Багато досліджень підтвердили, що колагеназа є безпечним і ефективним вибором для обробки шкірних уражень і опікових ран. Одне з найбільш відомих застосувань мікробних колагеназ у галузі охорони здоров'я пов'язане з використанням колагенази *C. histolyticum* у ферментативному обробленні ран та інших ушкоджень, де необхідне видалення девіталізованої тканини. Цей процес застосовується для лікування пролежнів, виразок на ногах, ран і опікових ран, а також хронічних, незагойних або млявих ран, які вважаються загальмованими у запальній фазі загоєння ран. Лікування цих хронічних незагойних виразок або ран є складною клінічною проблемою, і пошук ефективних терапевтичних засобів був ключовою метою протягом багатьох років. Фактично, ензимну дебридмандацію було запропоновано як терапію понад півстоліття тому і безперервно застосовується до теперішнього часу (Duarte, Correia & Esteves, 2016). У кількох дослідженнях ферментативні методи порівнювали з хірургічними/механічними методами, а також між кількома ферментами. Результати виявилися суперечливими. Проте ферментативні процедури виявляються трохи ефективнішими, коли субстратом є струп, а не фібрин. Використання колагенази *Clostridium* розглядається як приріст капіталу при обробці рани. Це допомагає уникнути ускладнень операції, а також обмежити прогресування та збільшення некротизованої тканини. Ферментативна санація

зменшує кількість хірургічних операцій і тривалість перебування в лікарні (Kahramanca та ін., 2014; Motley, Lange, Dickerson & Slade, 2014).

При використанні ін'єкційної колагенази для відновлення хряща відбувається значне збільшення компактності клітин хондроцитів у виразці. Обробка колагеназою після приготування високоякісного очищеного ферменту викликала відновлення хряща, можливо, за рахунок збільшення щільності клітин на краю ураження хряща. Таким чином, для кращого загоєння хірургічна операція з метою сприяння відновленню окремих дефектів хряща може бути корисною перед лікуванням цими ферментами (Garica, Mennan, Richardson, Wright & Roberts, 2014).

Іншим застосуванням колагенази є усунення фібропроліферативної тканини в окремих випадках вітректомії. Було встановлено, що задовільно очищена колагеназа може викликати значне розкладання рубцевої тканини після 10-, 15- або 30-хвилинної інкубації. Не було фенотипового пошкодження рубцевих клітинних ділянок або внутрішньої обмежувальної мембрани сітківки. 45-хвилинна експозиція сітківки перед пошкодженням фотокоагуляцією ферментом колагеназою також не призвела до морфологічного свідчення пошкодження (Chang, Hung, Hsu, Lin & Chen, 2015; Waibel та ін., 2016).

Останнім часом колагенази почали застосовувати в генетичній терапії. Насправді найпростішим і найбезпечнішим методом доставки генів може бути впровадження декорованих нуклеїнових кислот у клітини та тканини. Однак техніка генної терапії має один недолік, який полягає в низькій ефективності експресії генів. Макромолекули, такі як моноклональні антитіла та вектори ДНК, загалом виявляють низьку активність у солідних новоутвореннях для генної терапії. Застосування колагенази (очищеної або змішаної з гіалуронідазою) свідчить про ефективність трансфекції при поширенні метастазів, особливо при аномальному набряку будь-якої частини тіла з високим сегментом позаклітинного матриксу (Soria-Valles та ін., 2014). Також було доведено, що цей метод

ефективний у кісткових м’язах і тканинах печінки, де крім підвищення коефіцієнта трансфекції він викликає підвищення гомогенності трансфекції.

Міома матки - це лейоміома, яка виділяється з плоского м'язового шару матки. Захворювання часто різноманітне, і якщо матка містить забагато лейоміом, щоб підрахувати, це згадується як поширення лейоміоматозу матки. Після схвалення FDA як препарату, який не впливає на нервову систему чи кровоносні судини, колагеназа *C. histolyticum* була оцінена як відповідний засіб лікування цього захворювання (Brunengraber, Jayes & Leppert, 2014). Різноманітність типів і кількості колагену в особистих міомах може призвести до різних реакцій і вимагати додаткових досліджень. Ін'єкція колагенази *C. histolyticum* потенційно може бути використана для лікування міоми (Alipour, Raz, Zakeri & Djadid, 2016).

3.2. Перспективи використання желатиназ у медицині

Желатинази, зокрема ферменти MMP-2 та MMP-9, відіграють важливу роль у медицині завдяки своїй здатності розщеплювати позаклітинний матрикс. У лікуванні раку ці ферменти сприяють інвазії та метастазуванню пухлин шляхом руйнування компонентів позаклітинного матриксу. Інгібування MMP-2 та MMP-9 активно досліджується як можливий терапевтичний підхід, особливо для агресивних форм раку, таких як фібросаркома, де блокування цих ферментів може зменшити ріст та поширення пухлини (Swarnakar, Mishra & Chaudhuri, 2012).

Желатинази також мають застосування у загоєнні ран, оскільки вони регулюють ремоделювання позаклітинного матриксу, що є важливим для правильного відновлення тканин. Вони залучені в процеси запалення, регенерації тканин та ангіогенезу. Крім того, роль желатиназ у серцево-судинних захворюваннях привертає увагу, оскільки їхнє інгібування може запобігти руйнуванню матриксу, що пов'язане з атеросклерозом та іншими серцево-судинними патологіями (Shoari, 2024).

РОЗДІЛ 4. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

4.1. Характеристика біотехнологічного продукту

Колагеназа - це протеаза, яка розщеплює потрійний спіральний білок, званий колагеном. Існує три типи тканинних колагеназ, і вони належать до сімейства матричних металопротеїназ (MMP). Колагеназа, отримана з *Clostridium histolyticum,* має дуже сильну активність, оскільки вона розщеплює колаген з обох кінців при низьких температурах 4-10 °C. Сирі суміші колагенази містять два основних типи ферментів, а саме колагеназу та клострипаїн (Rochima, Sekar, Buwono, Afrianto & Pratama, 2016).

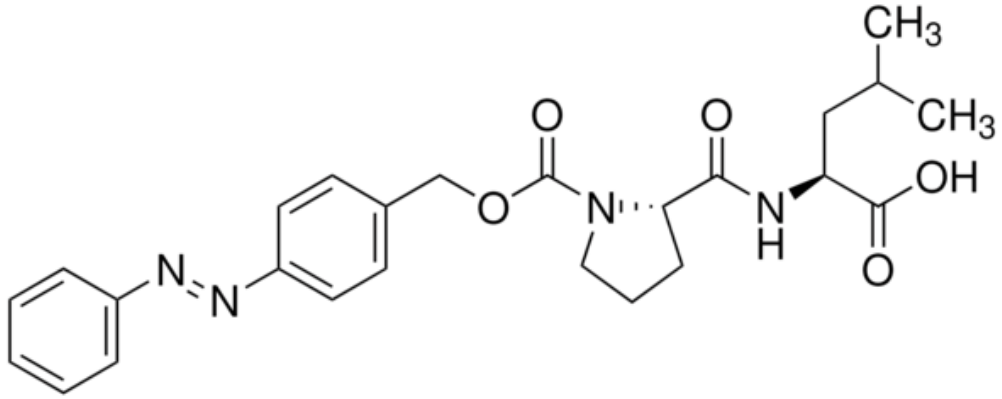


Рис. 4.1. **Структурна формула колагенази**

Колагеназа є унікальною протеазою, здатною спеціально гідролізувати нативний колаген. Він має сідлоподібну третинну структуру з цинковою частиною в активному центрі. Фрагмент цинку скоординований тетраедрично бічними ланцюгами двох гістидинів, одного глутамату та залишку води, при цьому молекула води додатково зв’язана водневим зв’язком з іншим залишком глутамату.

Продукт колагенази є сумішшю ферментів, що виділяються *C. histolyticum*, з різними продуктами, які диференціюються за відносним співвідношенням 10-18 компонентів, що містяться в секретованих ферментах. Основними компонентами є дві колагенази, клострипаїн і нейтральна протеаза. Синергічна дія цих ферментів руйнує колаген та інший внутрішньоклітинний матеріал. Дія як ферментів колагенази, так і нейтральної протеази необхідна для ефективного вивільнення клітин із тканини. Природними субстратами для колагенази є різні типи колагену.

Колагеназа активується чотириграммовим атомом кальцію на моль ферменту. Його інгібують етиленгліколь-біс(бета-аміноетиловий ефір) - N, N, N′,N′-тетраоцтова кислота, бета-меркаптоетанол, глутатіон, тіогліколева кислота та 8-гідроксихінолін (Chen та ін., 2020).

Основною функцією бактеріальних колагеназ є деградація колагену як амінокислоти та джерела азоту, і як такі вони забезпечують переробку колагену в рамках глобального циклу азоту (Kuypers та ін., 2018; Popoff, 2015). Однак вони також є актуальними як фактори вірулентності при деяких захворюваннях, таких як газова гангрена (*C. perfringens*) або ботулізм (*C. botulinum*) (Hatheway, 1990), і тому є цікавими мішенями для нових антибіотиків (Schönauer та ін., 2017).

4.2. Вибір форми випуску ЛЗ

Серед світових та вітчизняних виробників, найчастіше колагеназа представлена у формі мазі чи гелю. Це створює потребу у ліофілізованій формі препарату, так як низка хвороб потребує ін’єкційної методики лікування.

Потреба в ліофілізованій формі колагенази обумовлена низкою важливих переваг, що роблять її оптимальною для використання у сучасних медичних умовах. По-перше, ліофілізовані препарати мають тривалий термін зберігання без втрати ефективності, що є критично важливим в умовах обмеженого доступу до регулярних поставок. По-друге, ця форма забезпечує стабільність активних компонентів, що гарантує високу якість і терапевтичну ефективність препарату

навіть при транспортуванні та зберіганні у несприятливих умовах. Крім того, ліофілізовані ферментні препарати легко розчиняються перед застосуванням, що дозволяє швидко підготувати їх до використання в різних умовах.

4.3. Розрахунок потреби субстанції для випуску ЛЗ

4.3.1 Перелік виробників кінцевого продукту і виробників (постачальників) субстанції

На світовому ринку колагеназа широко використовується для медичних цілей, таких як лікування хвороби Дюпюїтрена, опіків та обморожень. Кілька провідних компаній виробляють цей ферментний препарат, забезпечуючи його високу якість та ефективність. Нижче наведено список основних виробників колагенази:

1. **Smith & Nephew** - один із провідних світових виробників, який випускає мазь Santyl. Ця мазь використовується для дебрідменту хронічних дермальних виразок, опіків та обморожень, допомагаючи розщеплювати мертву тканину та стимулювати ріст здорової.

2. **Endo Pharmaceuticals** - виробляє колагеназу для медичного застосування. Продукти цієї компанії відомі своєю високою якістю та ефективністю в лікуванні хвороби Дюпюїтрена та інших пошкоджень шкіри.

3. **Nordmark Arzneimittel GmbH & Co. KG** - німецька компанія, яка спеціалізується на виробництві колагенази для медичних цілей. Її продукти використовуються для догляду за ранами та ензимного дебрідменту.

4. **ДП «ЕНЗИМ»** - вітчизняний український виробник, що випускає гель «Іруксан». Це єдиний офіційний виробник колагенази на українському ринку.

Для узагальнення даних щодо виробників, було складено таблицю 4.1.

Таблиця 4.1

Огляд препаратів колагенази на світовому ринку

Виробник	Країна	Назва препарату	Форма випуску	Активність колагенази
Smith & Nephew	Великобританія	Santyl®	Мазь	250000 ОД/мг
Nordmark Arzneimittel GmbH & Co. KG	Німеччина	NB 6 GMP Grade; NB 1 GMP Grade; AF-1 GMP Grade.	Ліофілізований порошок	≥ 0,100 ОД/мг ≥ 3000 ОД/мг ≥ 3000 ОД/мг
Endo Pharmaceuticals	США	Xiaflex®	Ліофілізований порошок	0,58 мг*
ДП «ЕНЗИМ»	Україна	Іруксан	Гель	≥ 70000 КлА/мг

Примітка: * - виробник зазначає, що в 0,9 г препарату Xiaflex® міститься 0,58 мг ліофілізованої колагенази.

4.3.2 Розрахунок річної потужності виробництва субстанції, об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Колагеназа є єдиним схваленим фармацевтичним засобом для лікування хвороби Дюпюїтрена, який для призводить до кращих результатів із меншою кількістю ускладнень і побічних ефектів, ніж відкрита фасціектомія. Завдяки його неінвазивному застосуванню та швидкому введенню останніми роками зросло використання колагенази для лікування контрактури Дюпюїтрена. За даними експерементальних досліджень в цій галузі, було доведено, що доза колагенази в 3600 одиниць спричинила зниження модуля розтягування контрактури на 93% (Starkweather та ін., 1996).

Згідно джерел відомо, що лікувальна доза очищеної колагенази в препараті має становити 0,58 мг, тому приймемо, що ця кількість ліофілізату містить 3600 ОД, отже активність ферменту в мг повинна складати:

0,58 мг – 3600 ОД

1 мг – х

х = 3600 / 0,58 = 6206 ОД/мг.

Ін'єкцію колагенази для лікування контрактури Дюпюїтрена потрібно

робити один на 3-4 тижні, курсом від 3 до 8 процедур. Приймемо середнє значення – 5 процедур, тобто загальна цілкість ін'кції становить 5 разів.

В Україні немає офіційної статистики щодо хвороби Дюпюїтрена, але відомо, що одним з найголовніших етіологічних чинників її виникнення є цукровий діабет (ЦД). За даними Міжнародної діабетичної федерації (МДФУ, 2021) станом на 2021 рік, в Україні загальна кількість людей (від 20 до 79 років), які хворіють на ЦД складає 2 млн 325 тисяч. З деяких досліджень (Noble, Heathcote & Cohen, 1984; Lambi, Popoff, Benhaim & Barbe, 2023) відомо, що приблизно 40 % хворих на ЦД мають контрактури Дюпюїтрена. З огляду на це, приймемо, що 2325000*0,4 = 930 тисяч осіб в Україні має хворобу Дюпюїтрена.

Таблиця 4.2

Вихідні дані для розрахунку річної потреби населення України в препараті колагенази

Захворювання (профілактика)	**Доза препарату на добу, мг**	**Кількість ін'єкцій за курс**	**Кількість препарату на 1 людину, мг**	**Кількість хворих в Україні станом на 2021 р.***	**Загальна кількість субстрату на всіх хворих, мг**
Хвороба Дюпюїтрена	0,58	5	2,9	930000	2697000

Примітка: * - теоретично розраховано згідно статистики по Україні

Знаючи кількість препарату на одну людину та кількість хворих, можна розрахувати річну потребу у субстанції для населення України:

2,9*930000 = 2697000 мг

Тоді потужність виробництва складає:

$G_{гп}$ = 2697000 мг / 10^6 = 2,69 кг ≈ 3 кг.

Розраховуємо кількість культуральної рідини, яку необхідно одержати, щоб забезпечити на рік населення України субстанцією для лікарського препарату.

Так як даних щодо синтезувальної здатності продуцента *P. aurantiogriseum* URM4622 у літературі не наведено, то приймаємо синтезувальну здатність на рівні 0,5 г/л, через те що фермент колагеназа (субстанція) не відноситься до

конститутивних, а синтезується тільки за наявності індуктора. Знаючи концентрацію ферменту у культуральній рідині розраховуємо її кількість:

1 л культуральної рідини – 0,50 г

Х л культуральної рідини - 3000 г

Отримаємо, х = 3000/0,5 = 6000 л культуральної рідини.

Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера

Приймаємо кількість робочих днів на рік – 300, тоді кількість продукту за цикл становить:

$G_{цк} = G_{гп} * T_{цф}/24*T_{рд} = 6000*82/24*300 = 68,3$ л/цикл

Розрахуємо цикл роботи ферментера:

$$T_{цф} = T_{ф}+T_{др} = 72 +10 = 82 \text{ (год), де}$$

$T_{ф}$ – тривалість виробничої ферментації (біосинтезу);

$T_{др}$ – тривалість допоміжних робіт (допоміжні роботи включають: миття та огляд (2 год), перевірка на герметичність (2 год), стерилізація (2 год), охолодження (1 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

Отже, кількість циклів становить

$N_{цк} = G_{нт}/G_{цк} = 6000 / 68,3 = 87,8$

K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій.

Приймаємо $K_1 = 1,1$.

Враховуючи частку сухих речовин в готовому продукті, яка складає 0,95, та втрати при виділенні (50%), об'єм культуральної рідини складатиме:

$V_{кр} = K_1 \cdot G_{цк} * C_{гп}/P_{кр}(1-E_{св}) = 1,1*87,8*0,95/0,5*(1-0,50) = 367,2$ л/цикл

При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті крапле виносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10% ($E_ф$). Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$V_{роб1} = V_{кр} /(1-E_ф) = 367,2/(1-0,10) = 408$ л

Приблизний геометричний об'єм ферментера становить:

$V_г = V_{роб1}/К_ф = 408/0,6 = 680$ л.

Отже, для виробничого біосинтезу колагенази обираємо ферментер об'ємом 1000 л ($V_ф$).

Уточнюємо значення коефіцієнту заповнення ферментеру:

$К_{зап} = V_г/V_ф = 680/1000 = 0,68$, що не перевищує заданого значеня. За отриманим значенням можна зробити висновок, що об'єм ферментера було обрано вірно.

Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Виробничий біосинтез здійснюється у ферментері з геометричним об'ємом $V_ф = 1000$ л. Кількість посівного матеріалу (доза) для ферментера становить 10% від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$V_{пс1}= V_{роб1}/(1+X_ф) = 408/(1+0,1) = 370,9$ л,

де $X_ф= 0,1$ – доза посівного матеріалу.

Кількість посівного матеріалу становить:

$V_{пм1}= V_{роб1} – V_{пс1} = 408-370,9 = 37,1$ л.

Для одержання 37,1 л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10%. Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$V_{роб2} = V_{пм1}/(1-E_{па}) = 37,1/(1-0,10) = 41,2$ л.

Кількість інокуляту $V_{роб2}$ можна одержати під час культивування у посівному апараті геометричним об'ємом

$V_{па2} = V_{роб2}/К_{зап}= 41,2/0,6 = 68,6$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 100$ л. Уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$К_{з1}$= $V_{роб2}$/ $V_{сф}$ = 68,6/100 = 0,68.

Кількість посівного матеріалу (доза) для посівного апарата становить 10% від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі буде становити:

$V_{пс2} = V_{роб2}/(1+X_{па}) = 41,2/(1+0,1) = 37,45$ л,

де $X_{па} = 0,1$ – доза посівного матеріалу.

Кількість посівного матеріалу становить:

$V_{пм2} = V_{роб2} – V_{пс2} = 41,2 - 37,45 = 3,75$ л. Для одержання 3,75 л посівного матеріалу в малому інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10%.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становитиме:

$V_{роб3} = V_{пм2}/(1-E_{ін}) = 3,75/(1-0,10) = 4,16$ л.

Кількість інокуляту $V_{роб3}$ можна одержати під час культивування у малому інокуляторі геометричним об'ємом

$V_{ін3} = V_{роб3}/К_{зап} = 4,16/0,6 = 6,93$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом інокулятор $V_{сф} = 10$ л. Уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$К_{з1}$= $V_{роб3}$/ $V_{сф}$ = 4,16/10 = 0,4.

Кількість посівного матеріалу (доза) для малого інокулятора становить 10% від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі буде становити:

$V_{пс3} = V_{роб3}/(1+X_{ін}) = 4,16/(1+0,1) = 3,78$ л,

де $X_{ін} = 0,1$ – доза посівного матеріалу.

Кількість посівного матеріалу становить:

$V_{пм3} = V_{роб3}– V_{пс3} = 4,16 - 3,78 = 0,38$ л.

Кількість інокуляту для засіву малого інокулятора $V_{пм3} = 0,38$ л можна одержати культивуванням у колбах на качалці. Для цього використовують качалочці колби об'ємом $V_{колб} = 750$ мл та коефіцієнтом заповнення $К_{зк} = 0,2$.

Тоді кількість колб для одержання посівного матеріалу становить:

$N_{колб} = V_{пмз}/(V_{колб}*К_{зк}) = 380/750*0,2 = 2,5 = 3.$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 3 качалочні колби.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу у ферментері об’ємом 1000 л з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у 3 етапи.

Таким чином, за результатами розрахунків для біосинтезу приймаємо до встановлення один ферментер об’ємом 1000 л, один інокулятор об’ємом 100 л, один інокулятор об’ємом 10 л.

РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ СТАДІЙ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

5.1. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів отримання субстанції для виробництва ЛЗ

Колагенази є протеолітичними ферментами, відповідальними за деградацію спіральної ділянки нативного колагену на дрібні фрагменти. На відміну від колагеназ ссавців, які розщеплюють колагенову спіраль в одному місці, мікробні колагенази атакують кілька ділянок уздовж спіралі (Lima та ін., 2011).

При виборі способу виділення та очищення колагенази з культурального середовища необхідно враховувати такі аспекти:

1. Фізико-хімічні характеристики культурального середовища.

2. Властивості субстанції (чутливість до температури, стійкість до різних хімічних речовин).

3. Вимоги до кінцевого продукту, зокрема рівень чистоти.

Колагеназа, яка є продуктом культивування штаму *P. aurantiogriseum* URM4622 (Lima та ін., 2011), є позаклітинним метаболітом, тому виділення ферменту відбувається безпосередньо з культурального бульйону після процесу ферментації.

Колагенази секретуються як зимогени або неактивні попередники ферментів. Ці латентні ферменти потребують зміни структури (або активації) для досягнення колагенолітичної активності. Неактивні форми колагенази також можуть бути присутніми через взаємодію з іншими молекулами або інгібіторами, і розщеплення зв’язків між інгібіторами та колагеназами може бути необхідним для генерації колагенолітичної активності (Sellers et al., 1977). Таким чином,

додавання активаторів і контроль інгібіторів під час екстракції та очищення колагенази стає критичним. У будь-якому процесі, який використовується для виділення колагеназ, вкрай важливо уникнути денатурації ферменту та підтримувати його активність. У той час як ряд структур служать активаторами або інгібіторами, температура і pH вважаються найважливішими факторами для збереження активності ферменту.

Вплив температури на продукцію колагенази мікроорганізмами є важливим фактором. Температура може регулювати деякі компоненти, такі як ферментативний синтез, секрецію ферменту та тривалість фази синтезу ферменту, окрім властивостей клітинної стінки (Wanderley, Neto, Filho, Lima, Teixeira & Porto, 2017). Найкращими умовами для колагенази є температура на рівні 24 °C та pH 7,0, що забезпечує високу колагенолітичну активність.

Після процесу біосинтезу в культуральній рідині, окрім цільового продукту, можуть міститися клітинні залишки, такі як частинки зруйнованих або відмерлих клітин та частини клітинних оболонок. Також у рідині присутні побічні продукти метаболізму, що утворюються в процесі метаболічних реакцій, але не є основним цільовим продуктом. Крім того, залишаються поживні речовини, які не були спожиті або перетворені мікроорганізмами. Тобто першим етапом виділення колагенази буде відокремлення біомаси продуцента.

Після відділення біомаси в отриманому супернатанті містися багато домішок, тому наступний етап - звільнення ферментного розчину від сторонніх високомолекулярних речовин.

Наступним важливим етапом є видалення баластних речовин з ферментного розчину для досягнення високого ступеня чистоти препарату. Цей процес дозволить забезпечити отримання ферменту високої якості, що є необхідним для його подальшого застосування.

В медичній сфері колагеназа використовується у вигляді стерильного порошку для ін’єкцій. Тому наступним кроком буде сушіння.

Отже, підсумовуючи вищенаведену інформацію, технологія виробництва високоочищених ферментних препаратів виглядає так:

1) відокремлення біомаси від культуральної рідини;

2) концентрування та виділення ферменту;

3) очистка виділеного ферменту;

4) кристалізація;

5) сушіння.

5.1.1. Обґрунтування способу відділення культуральної рідини від біомаси

Протягом процесу культивування отримуємо 367,2 л культуральної рідини, яка в подальшому йде на процес виділення.

У більшості біореакторів мікроорганізми суспендовані в рідкому культуральному середовищі у вигляді окремих клітин, зграй або частинок, утворених міцелієм. Після завершення культивування вони повинні бути розділені за допомогою процесів поділу твердої частини та рідини, таких як седиментація, центрифугування, флотація або фільтрація.

Седиментація. Цей метод використовується для розділення сумішей, у яких компоненти мають різну щільність. Цей процес ґрунтується на тому, що тверді частинки під дією сили тяжіння осідають на дно ємності, утворюючи осад. У біотехнології метод седиментації застосовується для очищення та концентрації клітин і біомолекул. Його використовують у процесах виділення та фракціонування білків, нуклеїнових кислот і органел. Седиментація також допомагає у виробництві вакцин та біофармацевтичних препаратів, забезпечуючи відокремлення клітинних компонентів і вірусних частинок (Lassen, Carcia de Caldeano & Emborg, 1992).

Переваги:

1. Простий і дешевий, не вимагає складного обладнання.
2. Низький ризик пошкодження зразків зберігає біологічну активність клітин

та молекул.

3. Метод легко масштабувати від лабораторних умов до промислового виробництва.
4. Седиментація ефективна для відокремлення великих частинок і агрегатів.
5. Метод базується на природних процесах осідання, що важливо для збереження природних властивостей зразків.

Недоліки:

1. Осідання займає багато часу, особливо для дрібних частинок.
2. Залежність від гравітаційного поля: обмежує застосування у випадках, коли потрібні більш контрольовані умови.
3. Седиментація не підходить для дрібних частинок, оскільки їх осідання може бути повільним або не відбуватися взагалі.
4. Більшість методів седиментації важко автоматизувати, що збільшує трудомісткість процесу.

У висновку, седиментація не є оптимальним методом для виділення культуральної рідини через значні часові затрати, неоднорідність осідання частинок, потребу у додаткових обробках та потенційну втрату клітинної виживаності.

Фільтрація. Процес фільтрації включає пропускання суспензії (культурального бульйону) через фільтруюче середовище. Під дією рушійної сили суспензія утримується в пористому середовищі у вигляді фільтрату, а рідина, що залишилася, стікає вниз. Це полегшує розділення біомаси від культуральної рідини на основі рушійних сил під впливом тиску, сили тяжіння та вакууму (Lassen та ін., 1992).

Переваги:

1. Метод швидкий і ефективний для відокремлення великих частинок біомаси від рідини.
2. Фільтрація може бути легко автоматизована, що знижує трудомісткість

процесу.

3. Висока точність розділення, особливо з використанням мембранних фільтрів з визначеним розміром пор.
4. Можливість фільтрувати великі об'єми рідини за короткий час.
5. Збереження цілісності та біологічної активності клітин, оскільки процес не вимагає агресивних хімікатів або високих температур.

Недоліки:

1. Закупорювання фільтрів може бути проблемою, особливо при роботі з густими культурами або високим рівнем біомаси.
2. Вартість спеціалізованих мембранних фільтрів може бути високою.
3. Необхідність регулярної заміни або очищення фільтрів підвищує операційні витрати.
4. Метод менш ефективний для розділення дрібних частинок або молекул, які можуть проходити через пори фільтра.
5. У деяких випадках необхідна попередня обробка зразків, щоб уникнути закупорювання або пошкодження фільтрів.

Фільтрація може виявитися неефективною для виділення культуральної рідини через те, що густий біоматеріал чи великі частинки можуть швидко закупорювати пори фільтрів, що призводить до зниження ефективності і потребує частої заміни або очищення фільтрів. Крім того, фільтрація може виявитися неефективною для розділення дрібних частинок чи молекул, які можуть проходити через пори.

Флотація — це техніка розділення, що бере свій початок у мінеральній промисловості. У різних галузях промисловості, включаючи біотехнологію, він має великий потенціал застосування у високоцінних кінцевих продуктах, таких як білки (Ndikubwimana та ін., 2016). Принцип процесу флотації заснований на твердо-рідкій суспензії, де бульбашки утворюються повітрям або газом, а потім частинки (тобто частинки, які потрібно відокремити) прилипають до утворених

бульбашок. Ці бульбашки переносять частинки на поверхню ліпідів, де вони зазвичай збираються шляхом знежирення (Branyikova та ін., 2018).

Переваги:

1. Можливість обробляти великі об'єми культуральної рідини, що покращує продуктивність процесу.
2. Висока селективність в розділенні різних типів клітин та частинок за допомогою налаштування флотаційних агентів.
3. М'який режим обробки, що зменшує ризик пошкодження клітин та зберігає їх життєздатність.
4. Менша енергоємність порівняно з іншими методами розділення.

Недоліки:

1. Використання хімічних реагентів може вплинути на якість та безпеку продукту.
2. Складність налаштування процесу, що може вимагати значних зусиль для оптимізації умов.
3. Обмеження ефективності для дуже густих суспензій, де рівномірне розподілення флотаційних агентів є складним завданням.
4. Потенційні проблеми з піноутворенням, які можуть ускладнювати процес розділення.
5. Високі витрати на спеціалізовані флотаційні реагенти, що збільшують загальну вартість процесу.

Флотація може виявитися неефективною для виділення культуральної рідини через складність у налаштуванні оптимальних параметрів процесу, високі витрати на спеціалізовані флотаційні реагенти та потенційні проблеми з утворенням надмірної піни.

Центрифугування — це фізичний метод зневоднення, який залежить від генерації відцентрової сили, яка діє радіально та прискорює рух і розділення частинок на основі різниці в щільності між частинкою та середовищем, що її

оточує. У цьому випадку щільніша частинка рухатиметься назовні, а менш щільні — усередину.

Центрифугування є надійним у розділенні сильно розбавлених розчинів з використанням відповідної швидкості обертання. У цьому контексті процес поділу в основному залежить від розміру частинок і різниці щільності компонентів середовища. Використовуючи цей метод, можна досягти підвищеної концентрації біомаси та високої ефективності збору врожаю за короткий період часу. Ефективність загального процесу центрифугування в основному залежить від характеристик осідання клітин, часу утримування суспензії в центрифузі (який контролюється швидкістю потоку) і глибини осідання, яку можна мінімізувати за допомогою конструкції центрифуги (Najjar & Abu-Shamleh, 2020).

Переваги:

1. Швидке і ефективне відокремлення біомаси від рідини.
2. Висока точність розділення навіть для дрібних частинок.
3. Легка автоматизація процесу, що підвищує продуктивність.
4. Можливість обробки великих об'ємів рідини.
5. Збереження життєздатності клітин при правильних налаштуваннях.

Недоліки:

1. Висока вартість обладнання та обслуговування.
2. Значні енергетичні витрати, особливо при великих об'ємах.

Отже проаналізувавши всі вищенаведені методи розділення супернатанту від біомаси, обираємо центрифугування. Цей метод дозволяє ефективно розділити великі об’єми культуральної рідини за достатньо короткі терміни.

Вибір типу центрифуги для відділення культуральної рідини від біомаси залежить від кількох факторів, таких як об'єм зразків, необхідна швидкість розділення, тип біомаси та бюджет. Нижче наведено основні типи центрифуг:

— осаджувальні;

— фільтрувальні;

— комбіновані.

Фільтрувальні центрифуги використовують відцентрову силу для пропускання рідини через фільтр, залишаючи тверді частки на поверхні фільтра. Вони забезпечують високу ефективність розділення дрібних часток і можуть працювати безперервно. Такі центрифуги підходять для різних типів біомаси, але мають складнішу конструкцію, вимагають регулярної заміни або очищення фільтрів, що підвищує вартість обслуговування.

Комбіновані центрифуги поєднують в собі принципи осаджувальних та фільтрувальних центрифуг. Це дозволяє ефективно розділяти частки різних розмірів і щільностей, що робить їх універсальними у використанні. Вони можуть адаптуватися до різних умов розділення і забезпечують ефективне розділення як великих, так і дрібних часток. Однак, такі центрифуги є дорогими, складними в експлуатації та обслуговуванні, і потребують кваліфікованого персоналу для налаштування та роботи.

Осаджувальні центрифуги працюють на принципі використання відцентрової сили для осадження часток на дні ротора. Вони добре підходять для обробки великих об'ємів зразків і забезпечують високу швидкість розділення. Простота конструкції та експлуатації є їхньою суттєвою перевагою, що робить їх ефективними для відділення щільних часток. Проте, такі центрифуги менш ефективні для розділення дрібних або легких часток і потребують частого очищення від осаду.

Враховуючи наведену вище інформацію, оптимальним вибором цетрифуги для розділенням біомаси від культуральної рідини є осаджувальна, так як вона здатна забезпечити високу швидкість осадження щільних часток, що дозволяє ефективно розділяти зразки. Простота їх конструкції полегшує обслуговування та експлуатацію, а вартість обслуговування та експлуатації є меншою порівняно з фільтрувальними та комбінованими центрифугами.

Отже, враховуючи об’ємну концентрації культуральної рідини, потрібний ступінь відділення оберемо осаджувальну центрифугу **GEA Westfalia Separator OSB 35**.

Рис. 5.1. **Осаджувальна центрифуга GEA Westfalia Separator OSB 35**

Під час культивування отримуємо 367,2 л культуральної рідини, яка потім подається в збірник об’ємом 500 л. В рубашку збірника подається вода охолоджена для охолодження культуральної рідини до 5-10 °С, для зберігання перед центрифугуванням.

За приблизними розрахунками об'єм вологого осаду в суспензії становить приблизно 2570 мл, також втрати суспензії при центрифугуванні приймемо за середні 4,5 %, тоді втрати суспензії при центрифугуванні складатимуть 16,5 л. Разом об'єм отриманого супернатанту з урахуванням втрат при центрифугуванні складатиме приблизно 350 л, тобто для наступної стадії будемо розраховувати апарати, опираючись на цей об’єм.

5.1.2 Обґрунтування способу виділення цільового продукту з супернатанту

Наступним етапом є виділення колагенази з отриманого після центрифугування супернатанту. Основними вимогами до проведення процесу виділення є:

- проведення процесу в оптимальних умовах, при низькій температурі, для забезпечення оптимального ріня колагенолітичної активності;

- очищення супернатанту від високомолекулярних речовин, більше 100 кДа, з розрахунку, що молекулярна маса колагенази 95 кД.

Першим етапом виділення колагенази з культуральної рідини є концентрування. Основними методами є випарювання та мембранні методи – ультрафільтрація, мікрофільтрація, діаліз.

Випарювання — це процес видалення рідини (зазвичай води) з розчину шляхом її перетворення на пар, що призводить до концентрування розчинених речовин. Випарювання засноване на нагріванні розчину, що містить розчинені речовини, до температури, при якій розчинник (зазвичай вода) переходить у пароподібний стан. Процес може проходити за атмосферного тиску або під вакуумом (для зниження температури кипіння).

Випарювання є простим і прямим методом, але його недоліки, особливо пов'язані з тепловою денатурацією і енерговитратністю, роблять його менш підходящим для концентрування чутливих ферментів, таких як колагеназа.

Мікрофільтрація — це метод розділення для видалення частинок мікронного розміру, таких як бактерії, дріжджові клітини, колоїди та частинки диму, із суспензій або газів. У процесі використовуються мембранні фільтри з порами приблизного розміру від 0,1 до 10 мкм, які проникні для рідини, але затримують частинки, таким чином викликаючи поділ. Приклади частинок із розмірами в діапазоні мікрофільтрації представлені на рис. 5.2 (Huisman, 2000).

Мікрофільтрація ефективна для видалення великих часток і клітинних залишків, але не є оптимальним методом для концентрування білків, таких як колагеназа, через недостатню селективність мембрани для білків та можливі втрати ферменту.

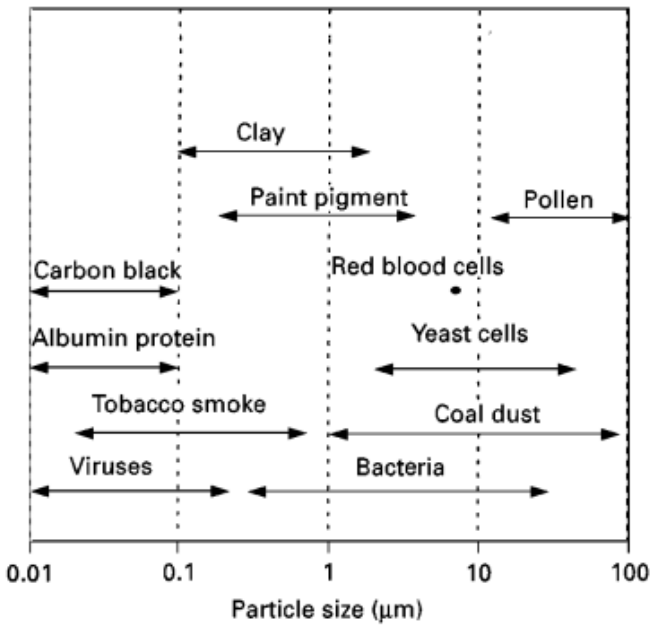


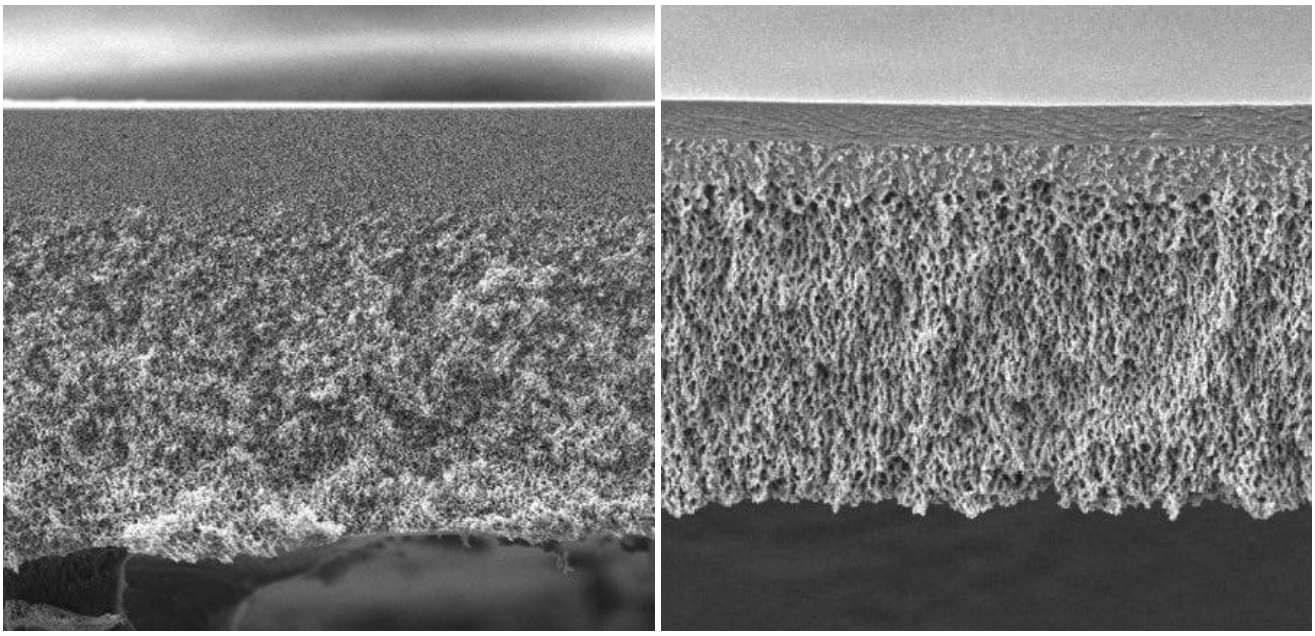
Рис. 5.2. **Частинки в діапазоні розмірів мікрофільтрації**

Діаліз — це техніка розділення, яка полегшує видалення малих непотрібних сполук із макромолекул у розчині шляхом вибіркової та пасивної дифузії через напівпроникну мембрану. Зразок і буферний розчин (так званий діалізат, зазвичай у 200-500 разів перевищує об’єм зразка) поміщають на протилежних сторонах мембрани. Молекули зразка, які більші за пори мембрани, утримуються на стороні мембрани зразка, але малі молекули та буферні солі вільно проходять через мембрану, зменшуючи концентрацію цих молекул у зразку. Зміна буфера діалізу видаляє малі молекули, яких більше немає в зразку, і дозволяє більшій кількості забруднювачів дифундувати в діалізат. Таким чином, концентрація дрібних забруднень у зразку може бути зменшена до прийнятного або незначного рівня (Craig & King, 2006).

Хоча діаліз є корисним методом для видалення малих молекул та солей, він не є оптимальним для концентрування колагенази через його повільність, обмежену здатність до концентрування, необхідність у великому об'ємі буферного розчину та можливі втрати матеріалу.

Ультрафільтрацію можна описати як процес, у якому розчинені речовини з високою молекулярною масою утримуються, коли розчинник і розчинені речовини з низькою молекулярною масою пропускаються під гідравлічним

тиском (від 2 до 10 атмосфер) через мембрану з дуже дрібним розміром пор, як правило, від 0,001 до 0,1 мкм (рис. 5.3). Тому його використовують для концентрації та очищення продукту. Доступний ряд мембран, виготовлених із різноманітних полімерних матеріалів, з різною межею молекулярної маси (500–500 000), що робить можливим розділення макромолекул, таких як білки, ферменти, гормони та віруси. Ключовими параметрами, що описують ефективність цих процесів ультрафільтрації, є потік фільтрату, який безпосередньо пов’язаний із проникністю мембрани, та селективність, яка визначається ступенем утримання білка (Stanbury та ін., 2017).



а **б**

Рис. 5.3. **Поперечний переріз ультрафільтраційної (а) та мікропористої (б) мембран**

Цей метод забезпечує найкращі результати при швидкому очищенні супернатанту від високомолекулярних сполук завдяки використанню фільтрів з малими порами.

Ультрафільтрація здійснюється за допомогою спеціалізованих мембран, які мають дуже дрібні пори, що дозволяють відокремлювати макромолекули від рідин. Це процес, що базується на фільтрації під тиском, де рідина проходить

через мембрану, залишаючи більші частки і молекули на поверхні мембрани. Ультрафільтраційні системи включають різні типи мембранних модулів і обладнання для оптимізації процесу.

Розмір пор мембрани повинен бути меншим за діаметр молекул колагенази, щоб затримувати на мембрані молекули ферменту, та пропускати низькомолекулярні домішки для одночасного концентрування ферменту та діалізу.

Для ефективного концентрування колагенази, необхідно пібрати мембрани з необхідним розміром пор, тому розрахуємо розміри пор мембран:

Молекулярна маса колагенази становить 95000 Да, діаметр молекул:

$$D = 0{,}098 \times M^{0.38} = 0{,}098 \times 95000^{0.38} \approx 7 \text{ нм}.$$

Отже, для концентрування колагенази та видалення низькомолекулярних домішок використовують мембрани з розміром пор 2 нм Ultracel® від компанії Mersk. Виділення ферменту проводитиметься на ультрафільтраційній установці **Cogent® Process-Scale** (рис. 5.4) з робочим об’ємом 30 л, продуктивність якої складає до 200 л за годину, при об’ємі супернатанту 350 л.

Рис. 5.4. **Зовнішній вигляд ультрафільтраційної установки**

Для розрахунку об’єму концентрату, що ми отримуємо після ультрафільтрації приймемо, що втрати у процесі становлять 9,5 %, тоді об’єм разом з втратами буде становити 316,75 л. У процесі ультрафільтрації приймемо, що коефіцієнт концентрування становитиме 10, тоді приблизно ми отримуємо 32 л концентрату для наступної стадії.

5.1.3 Обгрунтування способу попередньої очистки цільового продукту

Ключем до успішного та ефективного очищення ферменту є вибір відповідних методів, які максимізують вихід і чистоту за мінімальної кількості етапів. Першим етапом попередньої очистки ферменту є осадження сульфатом амонію. Цей метод дозволяє здійснити первинне очищення ферменту, максимально зберігаючи його активність і концентрацію.

Осадження сульфатом амонію є ефективним методом для відокремлення ферменту від інших компонентів, зокрема сторонніх білків і низькомолекулярних сполук. Сульфат амонію дозволяє здійснити селективне осадження білків за рахунок зміни їхньої розчинності внаслідок зміни іонної сили розчину. Цей процес дозволяє видалити більшість небажаних домішок на ранньому етапі очищення.

Перевагою цього методу є також те, що він є відносно простим у виконанні та не потребує складного обладнання. Осадження сульфатом амонію також дозволяє концентрувати фермент, зменшуючи об'єм розчину, що спрощує подальші етапи очищення. Додатково, цей метод забезпечує стабільність ферменту під час процесу, оскільки сульфат амонію запобігає денатурації білків (Bajpai, 2014).

Для осадження колагенази використовується 75 % розчин сульфату амонія (Wu та ін., 2009). Тобто, на кожен літр ферментного розчину необхідно 750 г сульфату амонію. Так як з попередньої стадії ультрафільтрації ми отримали 32 л концентрату, то нам знадобиться 24 кг сульфату амонію. Опираючись на цей

об’єм будемо використовувати реактор-змішувач об’ємом 50 л, у якому буде здійснюватися осадження колагенази сульфатом амонію.

Після осадження проводять центрифугування, щоб відокремити осад. Найбільш доцільно використовувати фільтруючі центрифуги для цього етапу, оскільки вони ефективно відділяють осаджений фермент від солі, що використовувалася для осадження.

В роботі, будемо використовувати фільтруючу центрифугу фірми **Krauss-Maffei HZ** (рис. 5.5), що дозволить нам відділити фермент.

Рис. 5.5. **Фільтруюча центрифуга Krauss-Maffei HZ**

Первагами центрифуги даної фірми є:

— Можна легко адаптувати до мінливих вимог процесу. Різні рецепти контролю можна використовувати для вибору оптимальної робочої швидкості та послідовності циклів для отримання продукту найвищої якості при максимальній потужності.

— Низька залишкова вологість торта завдяки високій відцентровій силі, адаптованій до певного продукту.

— Рівномірний розподіл миючої рідини, що досягається за допомогою горизонтальної конфігурації кошика та подачі через розподільник або

розпилювачі.

Розраховуємо приблизний об’єм осадженого ферменту: з 367,2 л культуральної рідини при концентрації ферменту 0,5 г/л ми маємо отримати 183,6 г абсолютно сухої колагенази; у процесі центрифугування (5 % втрат), ультрафільтрації (9,5 % втрат) та осадження (10 % втрат), за розрахунками, ми отримаємо 145 г абсолютно сухої колагенази (АБК). Враховуючи вміст вологи, приймемо 10 %, отримаємо 160 г вологого осаду. Отриманий розчин після осадження йде на знешкодження відходів.

5.1.4 Обгрунтування способу очищення цільового продукту

Після виділення сирого екстракту колагенази його необхідно очистити за допомогою одного з кількох хроматографічних методів, які можна класифікувати як: гель-фільтрація, іонообмін, гідрофобна взаємодія або спорідненість. На рисунку 5.6 показано принцип цих процесів очищення. Слід зазначити, що ці методи хроматографії зазвичай поєднуються разом, тому більшість схем очищення починаються з гель-фільтрації, а потім або іонообмінної, або афінної хроматографії**,** або обох, залежно від застосування.

Гель-фільтрація відома як ексклюзійна або молекулярно-ситова хроматографія - розділяє молекули за розміром. Це фізичне розділення, коли насадковий матеріал колонки містить пори, в які можуть потрапити й утриматися лише молекули певного розміру чи діапазону мас. Використовується багато комерційних гелевих матриць, таких як Sephadex (10, 25, 50, 75, 100 і G-200), Sepharose, Sephacryl, Sepharose CL і Bio-Gel. Ці різні матеріали мають

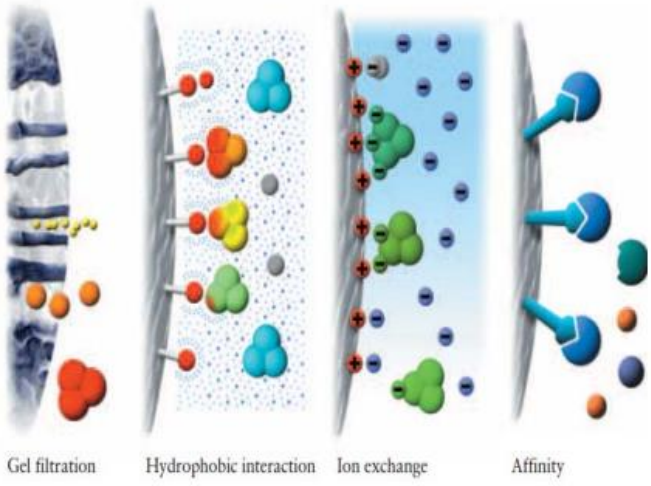


Рис. 5.6. **Принципи розділення в хроматографії очищення**

різні діапазони виключення розміру білка. Білки можна розділити, пропускаючи їх через відповідну колонку з гелевою смолою. Усю процедуру слід проводити при 4°C, а вибір типу гелю-порошку ґрунтується на конкретному білку(ах).

Афінна хроматографія використовує специфічну взаємодію між субстратом і біологічно активною речовиною і є найпотужнішим методом очищення білка. Цей метод заснований на високій спорідненості деяких білків до певних хімічних груп (лігандів), ковалентно прикріплених до матеріалу хроматографічного шару (Kaufman et al., 1995).

Іонообмінна хроматографія розділяє іони та полярні молекули відповідно до заряду. Вона ґрунтується на іонній взаємодії молекул аналіту з колонкою і може обмінюватися або аніонами, або катіонами. При даному pH більшість білків мають загальний негативний або позитивний заряд залежно від їх ізоелектричної точки (pI), отже, ці білки взаємодіють з протилежно зарядженою упаковкою колонки. Білки утримуються завдяки різній кількості зарядів, які вони несуть. Існує два типові колонки: (a) (CM) сефадекс діетиламіноетил (DEAE) целюлоза для зв'язування з негативно зарядженими протеїнами та (b) карбоксиметил для зв'язування позитивно заряджених білків (Kaufman et al., 1995).

При оптимальних рівнях pH (близько 7,0) колагеназа буде нести загальний негативний заряд, і необхідно використовувати аніонообмінні упаковки. Аніонообмінна хроматографія на основі діетиламіноетилцелюлози або агарози є, безумовно, найпоширенішим іонообмінним методом, який використовувався рядом дослідників для очищення колагенази.

DEAE-целюлоза є ефективним іонообмінним матеріалом для очищення та розділення аніонних молекул, таких як білки та нуклеїнові кислоти. Її використання в іоннообмінній хроматографії забезпечує високий рівень чистоти та ефективності виділення цільових молекул.

У різних методах екстракції використовуються різні буферні системи, включаючи тріс-HCl, бікарбонат натрію, хлорид кальцію та какодилатний буфер,

але всі вони включають використання осадження та центрифугування для виділення активного білка. Більшість методів проводять при фізіологічному pH (7,4-7,6) і температурі ≤ 4°C. Методи екстракції, які використовуються для цього ферменту, не повинні містити будь-яких органічних розчинників (для безпеки) і мати низький запас. Тому використання буферної системи є найпоширенішим методом.

Підсумовуючи вищевказане, як нерухому фазу використовуємо DEAE-целюлозу, як буфер - тріс-HCl з низькою концентрацією $CaCl_2$ (5-20 мМ) при значенні pH в діапазоні 7,4-7,6 і температурі нижче 4 °C.

Спочатку колонку попередньо збалансовують буфером тріс-HCI (50 мМ) з pH 7,4-7,6, потім отриманий ферментний осад після центрифугування (приблизно 160 г) розчиняють у 100-кратному об'ємі цього ж буферу з pH 7,5 тобто в 16 л та пропускають через колонку протягом 30 хв. Потім елюють 20 мМ $CaCl_2$ в тому ж буфері зі швидкістю потоку 50 мл / хв упродовж 90 хв.

Для цього етапу очищення колагенази обираємо хроматографічну систему **ÄKTA pilot™ 600S** (рис. 5.7), з діаметром колонки 110 мм.

Після елюції відбувається збір чистих фракцій ферменту; змішані фракції повторно циркулюють через колонки. Зокрема після хроматографії ми отримуємо з урахуванням втрат (5 %) приблизно 15,2 л розчину на подальший процес, з них абсолютно сухої колагенази (АБК) 137 г.

Рис. 5.7. **Зовнішній вигляд хроматографічної системи ÄKTA pilot™ 600S**

Після очистки ферменту за допомогою хроматографії необхідно провести повторну ультрафільтрацію для подальшого очищення і концентрації ферменту, а також для видалення дрібних забруднюючих часток, таких як солі, буферні компоненти або залишки реагентів. Ультрафільтрацію проводимо за допомогою установки **Cogent® Process-Scale** з мембранами з розміром пор 2 нм **Ultracel®** від компанії Mersk.

Щоб розрахувати об'єм концентрату, що ми отримуємо після ультрафільтрації приймемо, що втрати у процесі становлять 9,5 %, тоді об'єм разом з втратами буде становити 13,75 л. У процесі ультрафільтрації приймемо, що коефіцієнт концентрування становитиме 10, тоді приблизно ми отримуємо 1,37 л концентрату для наступної стадії в якому вміст абсолютно сухої колагенази становитиме 124 г.

Наступною стадією після ультрафільтрації є кристалізація.

Кристалізація — це процес, при якому розчинені речовини перетворюються на тверді кристали. Вона починається з насичення розчину, коли речовина досягає концентрації, при якій вона більше не розчиняється. Це може бути досягнуто за рахунок нагрівання розчину для збільшення розчинності або шляхом випаровування частини розчинника.

Процес починається з приготування розчину білка, який насичується до точки, коли білок починає утворювати кристали. Це може бути досягнуто шляхом зміни концентрації білка, pH або складу розчину. Потім відбувається нуклеація — формування перших зародків кристалів, і кристали починають рости. Коли кристали досягають потрібного розміру, їх відокремлюють від розчину і очищають (Gavira, 2016).

Щоб кристалізувати коллагеназу, pH розчину ферменту знижують до 7, використовуючи буферний розчин і pH-метр для точності. Потім у розчин додають поліетиленгліколь до концентрації 15%, тобто в 1,37 літра розчину вводять 135 грамів поліетиленгліколю. Для початку кристалізації додають

близько 0,5 – 2 грами ферменту. Суміш витримують у реакторі-змішувачі при кімнатній температурі (17-18°С) протягом приблизно одного тижня, в результаті чого утворюються білі або безбарвні кристали у вигляді голок або призматичних форм.

Далі здійснюють відокремлення кристалічного осаду центрифугуванням за допомогою фільтруючої центрифуги **Rousselet Robatel RC 30 Vx** з робочим об'ємом до 2,75 л.

У процесі кристалізації та подальшого центрифугування за приблизними розрахунками та з урахуванням втрат у процесі кристалізації та центрифугування (5 %) отримаємо 117 г абсолютно сухого ферменту.

5.1.5 Обгрунтування способу сушіння

Процес сушіння є ключовим етапом у підготовці і збереженні біологічних матеріалів, таких як коллагеназа. Сушіння дозволяє видалити вологу з розчину або речовини, що запобігає росту мікроорганізмів і зменшує ризик хімічної деградації. Для термочутливих компонентів, як коллагеназа, вибір правильного методу сушіння критично важливий, оскільки він може вплинути на активність та стабільність продукту.

Ліофілізація є найбільш підходящим методом для сушіння коллагенази через кілька ключових причин. Коллагеназа — це білковий фермент, який дуже чутливий до високих температур. При тепловому сушінні ризик денатурації білка дуже високий, оскільки під впливом високих температур структура білка може змінюватися, що призводить до втрати його активності. Ліофілізація ж відбувається при низьких температурах і під вакуумом, що суттєво знижує ризик термічної денатурації та дозволяє зберегти природну структуру ферменту.

Процес ліофілізації включає заморожування розчину і подальше видалення води шляхом сублимації, тобто перетворення води з рідкого стану безпосередньо в пар. Це особливо важливо для коллагенази, оскільки така процедура запобігає денатурації білка і допомагає зберегти його активність.

Ліофілізовані продукти мають тривалий термін зберігання завдяки дуже низькому вмісту води, що значно зменшує ризик росту мікроорганізмів і хімічної деградації. Це є важливим для забезпечення стабільності коллагенази протягом тривалого часу. Ліофілізація також полегшує процес відновлення коллагенази до активної форми, оскільки фермент легко відновлюється у рідині без втрати своєї функціональності.

Нарешті, ліофілізація є особливо корисною для термочутливих речовин, таких як коллагеназа, оскільки вона дозволяє уникнути впливу високих температур, які можуть негативно вплинути на їхню структуру і активність. Всі ці фактори роблять ліофілізацію ідеальним методом для сушіння коллагенази, забезпечуючи збереження її активності, тривале зберігання і легкість відновлення. (Ó'Fágáin, 2004).

Отже для процесу сушіння вибираємо лабораторну ліофільну сушарку серії **FD-10** від компанії **«Облана»** (рис. 5.8). Об'єм даної сушарки становить до 2 л, що задовольняє потреби проектованого виробництва.

Рис. 5.8. **Зовнішній вигляд ліофільної сушарки FD-10 від компанії «Облана»**

Перед процесом ліофілізації суспензії бактерій необхідно спочатку заморозити, а потім висушити під вакуумом. Однак без відповідного захисного середовища ліофільна сушка серйозно пошкоджує клітинні мембрани та білки, викликаючи зниження життєздатності. Тип захисного засобу багато в чому залежить від мікроорганізму; однак є кілька, які, здається, добре працюють з багатьма видами. До них відносяться знежирене сухе молоко, сироватка, трегалоза, гліцерин, бетаїн, адонітол, сахароза, глюкоза, лактоза та полімери, такі як декстран і поліетиленгліколь (Morgan та ін., 2006).

Оскільки отриманий фермент планується використовувати у фармацевтичному виробництві, доцільно застосувати захисне середовище, наприклад, з желатином або бичачим сироватковим альбуміном. Проте, з огляду на економічні міркування, вибір зупиняється на желатині.

Співвідношення ферменту та желатину складатиме 1:0,2 з огляду на збереження високої активності ферменту. Спочатку ми переносимо отриманий фермент масою 117 г у колбу на 600 мл, потім доливаємо 200 мл 50 мМ фосфорного буферу (pH 7), додаємо 23,4 г желатину та перемішуємо. Далі виливаємо все на піддони для подальшої сушки.

Отже, сушіння колагенази здійснюватиметься за допомогою ліофілізованої сушарки, оскільки вона забезпечує тривале збереження структури ферменту та низький ризик забруднення продукту, і з урахуванням витрат (3 %) ми отримаємо 113 г абсолютно сухого ферменту.

Після сушіння отриманий продукт потрібно упакувати для подальшої реалізації.

5.1.6. Обгрунтування вибору допоміжних робіт

Допоміжні роботи при виділенні та очищенні колагенази включають приготування допоміжних розчинів:

1) Буферу для іонообмінної хроматографії (Daboor, 2010).

Приготування робочого 50 мМ буфера тріс-HCI з pH 7,5:

Щоб приготувати 16 літрів буфера тріс-HCI з концентрацією 50 мМ, спочатку потрібно розрахувати необхідну кількість тріс-HCI. Молекулярна маса тріс-HCI становить приблизно 121,14 г/моль. На основі цього, для отримання 50 мМ розчину у обсязі 16 літрів, потрібно розрахувати масу тріс-HCI, яка дорівнює 96,912 г.

Зважену кількість тріс-HCI поміщають у реактор об'ємом 30 л, додають 16 деоінізованої води та перемішують до повного розчинення. В кінці перевіряють pH розчину і при потребі корегують його до pH на рівні 7,5.

2) 20 мМ розчину $CaCl_2$ для елюції колагенази при іонообмінній хроматографії.

20 мМ $CaCl_2$ = 0,020 М

Молекулярна маса $CaCl_2$ дорівнює 111 г/моль, отже:

В 1 моль – 111 г

В 0,020 моль – Х

$X=111\times0,020=2,22$ г

Отже, концентрація розчину становить 2,22 г/л.

Для приготування 20 мМ розчину 2,22 г $CaCl_2$ розчиняють у 1 л дистильованої води. Нам потрібно приблизно 4,5 л для елюції, тому для приготування розчину необхідно 10 г $CaCl_2$ розчинити у 4,5 л дистильованої води.

3) Розрахунок кількості сульфату амонію для осадження.

Розрахуємо концентрацію розчину:

На кожен літр ферментного розчину необхідно 700 г сульфату амонію. Так як з попередньої стадії ультрафільтрації ми отримали 34,2 л концентрату, то нам знадобиться 24 кг сульфату амонію. Опираючись на цей об'єм будемо використовувати реактор-змішувач об'ємом 100 л, у якому здійснюється осадження хондроїтинази сульфатом амонію.

4) Розрахунок кількості поліетиленгліколю для кристалізації.

Розрахуємо концентрацію розчину:

Ми маємо отримати розчин з концентрацією поліетиленгліколю 15 %. Отриманий після ультрафільтрації розчин об’ємом 1,37 л ми переносимо в реакторзмішувач об’ємом 3 л та додаємо 135 г поліетиленгліколю.

5) Приготування захисного середовища

Співвідношення ферменту та желатину складатиме 1:0,4. Спочатку ми переносимо отриманий фермент масою 117 г у колбу на 600 мл, потім доливаємо 200 мл 50 мМ фосфорного буферу (pH 7) та додаємо 23,4 г желатину та перемішуємо.

5.2. Обґрунтування вибору форми та упаковки колагенази

5.2.1 Обґрунтування форми випуску колагенази

Колагеназа є ферментом, який широко застосовується в медицині завдяки здатності розщеплювати колаген, основний компонент сполучної тканини. Її використання ефективне для лікування різних патологій, таких як контрактура Дюпюїтрена, рубці, гематоми та інші фіброзні ураження. Ін’єкційна форма є найбільш доцільною для колагенази, оскільки дозволяє доставляти препарат безпосередньо до ураженої ділянки, забезпечуючи локальну дію та мінімізуючи побічний вплив на здорові тканини. Крім того, така форма гарантує швидкий терапевтичний ефект і дозволяє медичному персоналу точно контролювати дозування та має низку переваг:

1. **Швидка дія.** Ін’єкції забезпечують миттєве надходження активної речовини у кровотік, минаючи травний тракт, що особливо важливо у випадках гострих станів чи необхідності термінового лікування.
2. **Висока біодоступність.** Ін’єкційна форма гарантує майже повне засвоєння діючої речовини, уникаючи втрат, які можуть виникати через вплив шлункового соку чи ферментів у травній системі.
3. **Можливість застосування у пацієнтів із труднощами ковтання.** Ін’єкції підходять для людей, які не можуть приймати таблетки через фізичні чи

медичні обмеження, наприклад, післяопераційний стан, порушення ковтання або втрата свідомості.

4. **Точність дозування.** Ін’єкції дозволяють доставляти строго визначену кількість препарату без ризику її зменшення через процеси травлення.
5. **Ефективність у лікуванні тяжких захворювань.** Ін’єкційна форма ідеально підходить для терапії серйозних станів, таких як сепсис, тяжкі інфекції чи онкологічні захворювання, де потрібна висока концентрація препарату у крові.
6. **Застосування в екстрених ситуаціях.** У випадках гострих реакцій, травм чи анафілактичного шоку ін’єкції є найшвидшим способом введення необхідного препарату.

5.2.2. Обґрунтування вибору первинної і вторинної упаковки ЛЗ

Для забезпечення стабільності, ефективності та безпечності колагенази вибір упаковки є надзвичайно важливим. Як первинну упаковку доцільно використовувати скляні флакони або ампули з матеріалу, стійкого до ферментативної активності колагенази, що забезпечує герметичність і захист від зовнішніх факторів, таких як світло, вологість чи кисень. Це дозволяє зберегти активність препарату протягом усього терміну придатності.

Вторинна упаковка, представлена картонними коробками, виконує функцію захисту первинної тари від механічних пошкоджень під час транспортування і зберігання. Вона також забезпечує споживача необхідною інформацією про препарат, включаючи інструкцію із застосування. Такий підхід гарантує ефективність препарату та відповідає стандартам якості.

5.3. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

Вихідні дані:

1) Об’єм культуральної рідини з однієї ферментації ($V_{кр}$) = 0,13 м^3;

2) Концентрація колагенази в культуральній рідині ($C_{кол\text{-}зи}$) = 1147 Од/мл;

3) Втрати на стадіях виділення і очищення колагенази ($W_{втрат}$) = 46,5 %;

Початкова кількість сухої колагенази в культуральній рідині складає 0,5*367,2 = 183,6 г, а кінцева кількість сухої колагенази, з урахуванням 46,5 %-ів втрат, має становити 113 г. Розподіл втрат по усім стадіям виділення і очищення наведено в таблиці 5.1.

Таблиця 5.1

Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіям

№ з/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіям			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати (разом 51 %)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
ТП 2 Відокремлення культуральної рідини						
2	ТП 2.1 Відділення культуральної рідини від біомаси	Суспензія	367,2 л	4,5%	350 л	Осаджувальна центрифуга Продуктивність – 100 л/год
		Вологий осад	2,75 л	-	-	
ТП 3 Ультрафільтрація						
3	ТП 3.1 Ультрафільтрація супернатанту	Супернатант	350 л	9,5%	316,75 л	Ультрафільтраційна установка Продуктивність – 200 л/год
		Концентрат	316,75 л	-	32 л	
ТП 4 Попереднє очищення колагенази						
4	ТП 4.1 Осадження концентрату	Концентрат	32 л	10%	28,8 л	Реактор-змішувач об’ємом 50 л
		Сульфат амонію	24 кг	-	-	
5	ТП 4.2 Відокремлення ферментного осаду	Осаджений концентрат	28,8 л	-	-	Фільтрувальна центрифуга Продуктивність – 10 л/год
		Вологий ферментний осад	160 г	-	-	
ТП 5 Очищення колагенази						
6	ТП 5.1 Змішування осаду з тріс-HCI буфером	Вологий ферментний осад	160 г	-	-	Хроматографічна система, діаметр колонки 110 мм
		тріс-HCI буфер	16 л	-	-	
		$CaCl_2$	4,5 л	-	-	
		Екстракт	16 л	5%	15,2 л	

*Закінчення таблиці 5.*1

7	ТП 5.2 Ультрафільтрація екстракту	Екстракт	15,2 л	9,5%	13,75 л	Ультрафільтраційна установка з мембранами з розміром пор 2 нм Продуктивність – 200 л/год
		Концентрований екстракт	13,75 л (коефіцієнт 10)	-	1,37 л	
ТП 6 Кристалізація колагенази						
8	ТП 6.1 Кристалізація екстракту	Концентрований екстракт	1,37 л	-	-	Реактор-змішувач об’ємом 5 л
		Буферний розчин (до pH 7)	-	-	-	
		Поліетиленгліколь	135 г (15%)	-	-	
		Колагеназа	0,5-2 г	-	-	
9	ТП 6.2 Відокремлення кристалічного осаду	Крисатлізована колагеназа	1,37 л	-	-	Фільтрувальна центрифуга Продуктивність – 3000 об/хв
		АБК	124 г	5%	117 г	
ТП 7 Приготування розчину препарату						
10	ТП 7.1 Приготування розчину препарату	АБК	117 г	-	117 г	Реактор-змішувач об’ємом – 2 л
		Вода ін’єкційна	1 л	-	-	
		Желатин	23,4 г	-	-	
		Фосфатний буфер (50 мМ)	200 мл	-	-	
ТП 8 Отримання ліофілізату						
11	ТП 8.1. Заморожування препарату	Розчин колагенази	117 г (АБК)	-	-	Ліофілільна сушарка Об’єм завантаження – 1,2 л
12	ТП 8.2 Сублімаційне сушіння	Заморожений розчин колагенази	117 г (АБК)	3%	113 г	
ПМВ 19 Пакування, маркування та відвантаження						
13	ПМВ 9.1 Закупорювання	Флакон з колагеназою	113 г (АБК)	-	-	Апарат для закупорювання
		Гумова пробка	-	-	-	
		Алюмінієва кришка	-	-	-	
14	ПМВ 9.2 Пакування	Колагеназа у первинній тарі	113 г (АБК)	-	-	Пакувальна машина

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання ділянки стадій виділення колагенази

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
Р-1 Р-22	Реактор-змішувач	2	Реактор-змішувач об'ємом 30 л з перемішуючим пристроєм (0-680 об/хв) з рубашкою. Матеріал – нержавіюча сталь (внутрішній шар SUS316 і зовнішній шар SUS304) Виробник: «ACHIEVE CHEM» (Китай)
Д-2 Д-5 Д-15 Д-30	Об'ємно-ваговий дозатор	4	Дозатор ваговий автоматичний GD1. Діапазон: 1–500 г (мл). Матеріал – нержавіюча сталь. Виробник: Tschritter GmbH (Німеччина)
Н-3 Н-6 Н-8 Н-14 Н-17 Н-20 Н-23 Н-28 Н-31	Перистальтичний насос	9	Серія: Rotho PSF2 Розхід - від 8 до 712 л/год, тиск - до 8-15 бар, діаметр шланга - 16 мм Виробник: «Ватерпасс» (Україна)
Р-4	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач об'ємом 10 л з перемішуючим пристроєм (0-680 об/хв) з рубашкою. Матеріал – нержавіюча сталь (внутрішній шар SUS316 і зовнішній шар SUS304) Виробник: «ACHIEVE CHEM» (Китай)
Р-7	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач об'ємом 700 л з перемішуючим пристроєм (0-680 об/хв) з рубашкою. Матеріал – нержавіюча сталь AISI 316L Ra Розмір (Д х В х Ш), мм - 1000 х 1250 х 1800 Виробник: «Danfoss» (Данія)

Продовження таблиці 6.1

Ц-9	Центрифуга осаджувальна	1	Осаджувальна центрифуга GEA Westfalia Separator OSB 35. Робочий об'єм: 100 л. Мішалка: 0-6000 об/хв. Виробник: «GEA Group» (Німеччина)
Ф-12	Фільтр попередньої очистки	1	Фільтр тонкої очистки NTR9 класу F9. Фільтруючий матеріал скловолокно. Максимальна робоча температура: 65 °С. Ступінь очищення становить 90- 95 % Виробник: «General filter» (Італія)
УФ-13 Н-10 Р-11 Ф-12	Ультрафільтраційна установка	4	Ультрафільтраційна установка Cogent® Process-Scale з горизонтальними фільтрувальними елементами, складається зі збірника (Р-11) об'ємом 700 л, насоса (Н-10), попереднього фільтра (Ф-12). Продуктивність установки – 500 л/год Виробник: «MilliporeSigma» (Німеччина)
Р-15	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач об'ємом 100 л з перемішуючим пристроєм (0-680 об/хв) з рубашкою. Матеріал – нержавіюча сталь (внутрішній шар SUS316 і зовнішній шар SUS304) Виробник: «ACHIEVE CHEM» (Китай)
Ц-18	Центрифуга фільтрувальна	1	Фільтрувальна центрифуга Krauss-Maffei HZ Робочий об'єм: 3 л. Мішалка: 0-3000 об/хв. Виробник: «ANDRITZ AG» (Австрія)
Р-19	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач об'ємом 40 л з перемішуючим пристроєм (0-680 об/хв) з рубашкою. Матеріал – нержавіюча сталь (внутрішній шар SUS316 і зовнішній шар SUS304) Виробник: «ACHIEVE CHEM» (Китай)
ХС-21	Хроматографічна система	1	Хроматографічна система ÄKTA pilot™ 600S Діаметр колонки: 110 мм Швидкість потоку до 600 мл/хв Виробник: «Cytiva» (Швеція)
УФ-27 Р-24 Н-25 Ф-26	Ультрафільтраційна установка	4	Ультрафільтраційна установка Cogent® Process-Scale з горизонтальними фільтрувальними елементами, складається зі збірника (Р-24) об'ємом 30 л, насоса (Н-23), попереднього фільтра (Ф-26). Продуктивність установки – 500 л/год Виробник: «MilliporeSigma» (Німеччина)

Закінчення таблиці 6.1

Р-29	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач об’ємом 5 л з перемішуючим пристроєм (0-680 об/хв) з рубашкою. Матеріал – нержавіюча сталь (внутрішній шар SUS316 і зовнішній шар SUS304) Виробник: «ACHIEVE CHEM» (Китай)
Ц-32	Центрифуга фільтрувальна	1	Фільтрувальна центрифуга Rousselet Robatel RC 30 Vx. Робочий об’єм: 2,75 л. Мішалка: 0-3000 об/хв. Виробник: «Rousselet Robatel» (Франція)
Р-33	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач об’ємом 2 л з перемішуючим пристроєм (0-680 об/хв) з рубашкою. Матеріал – нержавіюча сталь (внутрішній шар SUS316 і зовнішній шар SUS304) Виробник: «ACHIEVE CHEM» (Китай)
АДН-34	Апарат для наповнення флаконів	1	Апарат для навовнення флакоів Macofar LF 200. Апарат може зповнювати ампули об’ємом від 2 до 500 мл., за годину даний апарат може заповнити 12 тисяч ампул. Виробник:США
ЛС-35	Ліофільна сушарка	1	Ліофільна сушарка серії FD-10 Температурний діапазон роботи від -50 до + 70 °С. Робочий об’єм – 2 л. Виробник: «Облана» (Україна)
ЗА-36	Апарат для закупорювання флаконів	1	Апарат для закупорювання флаконів, модель CVC 1206- H2. Продкутивність 180 флаконів в хвилину. Виробник: CVC Technologies (Китай)

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ КОЛАГЕНАЗИ

ДР 1. Приготування допоміжних розчинів

ДР 1.1. Приготування тріс-HCI буфера (50 мМ)

Для приготування буфера, у реактор-змішувач на 30 л (Р-1), за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-2), додають 16 л деіонізованої води, потім вручну завантажують 97 г тріс-HCI (50 мМ), та включають мішалку. Рівень pH (7,4 - 7,6) корегують концентрованою HCI. Приготований буфер відправляється на стадію очищення колагенази (*ТП 5.1*).

ДР 1.2. Приготування розчину $CaCl_2$ (20 мМ)

Для приготування розчину $CaCl_2$ в концентрації 20 мМ, у реактор об'ємом 10 л (Р-4) подають 4,5 л дистильованої води за допомогою дозатора (Д-5) та вносять 100 г солі $CaCl_2$ та перемішують до повного розчинення солі. Приготований розчин відправляється на стадію очищення колагенази (*ТП 5.1*).

ДР 1.3. Приготування 6-% розчину HCl для етапу кристалізації

У колбу об'ємом 200 мл циліндром наливають 83 мл дистильованої води, далі за допомогою мірного циліндру відміряють і додають 17,2 мл 35% розчину HCl та перемішують. Розчин роблять під витяжною шафою, відміряють за допомогою скляного мірного стакана та обов'язково саме до стерильної дистильованої води додають 35%-ну HCI, а не навпаки (для уникнення сильної екзотермічної реакції). Закривають скляною пробкою. Приготований розчин відправляється на стадію кристалізації (*ТП 6.1*).

ТП 2. Відокремлення культуральної рідини

ТП 2.1 Відділення культуральної рідини від біомаси

Одержану культуральну рідину (367,2 л) після біосинтезу, перекачують до збірника об'ємом 700 л (Р-7) для зберігання ферментаційного бульйону.

Для відокремлення біомаси, за допомогою перистальтичного насосу (Н-8), культуральну рідину перекачують до осаджувальної центрифуги (Ц-9). Встановлюється режим 3000 об/хв протягом 15 хвилин.

Відокремлена біомаса йде на утилізацію (до *ЗВ 10.1*), а культуральна рідина на процес ультрафільтрації (*ТП 3.1*).

ТП 3. Ультрафільтрація

ТП 3.1 Ультрафільтрація супернатанту

Відділений від біомаси супернатант (316,75 л) за допомогою перистальтичного насоса (Н-10) перкачують до реактора об'ємом 700 л (Р-11) через фільтр попередньої очистки (Ф-12), звідки фільтрат подається до ультрафільтраційної установки (УФ-13) де протягом 80 хв при температурі 5 ºС здійснюється ультрафільтрація на мембранах з діаметром пор 2 нм. Промивання мембран здійснюють водою для ін'єкцій.

Тверді відходи, що утворилися в результаті фільтрації, утилізуються на *ЗВ 10.1*.

ТП 4. Попереднє очищення колагенази

ТП 4.1. Осадження концентрату

Після ультрафільтрації (від *ТП 3.1*) концентрат об'ємом 32 л подають за допомогою перистальтичного насосу (Н-14) у реактор-змішувач об'ємом 100 л (Р-15), у якому здійснюється осадження колагенази сульфатом амонію. Осадження здійснюють при концентрації сульфату амонію 75 % за температури 5 °С.

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-16), подають 24 кг сульфату амонію окремими порціями при постійному перемішуванні і залишається на 16

годин. Осадження ферменту відбувається за температури 5 °С протягом 36 год, при постійному перемішуванні. Після осадження концентрат (28,8 л) центрифугують (*ТП 4.2*).

ТП 4.2. Відокремлення ферментного осаду

Після осадження розчин ферменту (від *ТП 4.1*) за допомогою перистальтичного насосу (Н-17) розчин подається для подальшого осадження у фільтруючу центрифугу (Ц-18), де здійснюється центрифугування при 1940 об/хв протягом 80 хв за температури 5 °С.

Осад видаляється автоматично за допомогою ножа, зрізаючого осад, який подається до розвантажувального бункеру, а далі переноситься у збірник об'ємом 40 л для подальшої хроматографії (Р-19).

Фільтрат після центрифугування направляється на знешкодження відходів (*ЗВ 10.1*).

ТП 5. Очищення колагенази

ТП 5.1. Іонообмінна хроматографія

Процес іонообмінної хроматографії відбуватиметься на хроматографічній системі (ХС-21) на аніонообмінній смолі DEAE-целюлозі.

Спочатку колонки промивають 50 мМ тріс-HCI буфером з pH 7,5. Далі до осаду (від *ТП 4.2*) у реактор (Р-19) через перестальтичний насос (Н-3) перекачується розчин буферу з реактора (Р-1), вмикається перемішування та розчиняється у попередньо приготовленому буферному розчині pH 7,5 (від *ДР 1.1*).

Буферний розчин з ферментом з реактора-змішувача (Р-19) подається за допомогою перистальтичного насосу (Н-20) на хроматографічну систему (ХС-21) і циркулюється протягом 30 хв.

Після проходження процесу сорбції на смолі, потім елюють 20 мМ $CaCl_2$ в тому ж буфері зі швидкістю потоку 50 мл / хв упродовж 90 хв при 5°С, який подається з реактора (Р-4) за допомогою перистальтичного насоса (Н-6) (від *ДР*

2.2). Після елюції ферменту, чисті фракції колагенази подаються у збірник об’ємом 30 л (Р-22).

ТП 5.2. Ультрафільтрація екстракту

Ферментний екстракт об’ємом 15,2 л (від *ТП 5.1*), зі збірника (Р-22) за допомогою перистальтичного насосу (Н-23) завантажують у збірник УФ (Р-24) звідки за допомогою відцентрового насоса (Н-25) через фільтр попередньої очистки (Ф-26) подається на ультрафільтраційний модуль (УФ-27) де протягом 10 хв при температурі 5 °С здійснюється ультрафільтрація на мембранах з діаметром пор 2 нм. Промивання мембран здійснюють водою для ін’єкцій.

Після ультрафільтрації концентрат ферменту об’ємом 1,37 л за допомогою перистальтичного насосу (Н-28) подається у реактор-змішувач об’ємом 5 л (Р-29) для подальшої кристалізації колагенази.

Пермеат відводиться по центральній трубі і передається на знешкодження відходів (*ЗВ 10.1).*

ТП 6. Кристалізація колагенази

ТП 6.1. Кристалізація

У реактор-змішувач об’ємом 5 л (Р-29) з концентратом ферменту об’ємом 1,37 л у якому буде здійснюється кристалізація колагенази додають 8,5% (об/об) розчин фосфорної кислоти для корекції pH до 7,5 (вимір pH-метром). Вмикають перемішуючий пристрій. Через ваговий дозатор (Д-30) подають 135 г поліетиленгліколю при постійному перемішуванні та затравку готового ферменту 0,5-2 г. Подають в рубашку холодну воду знижуючи температуру розчину до 4-6 °С. Через тричі через кожні 3 години ступінчасто знижують pH розчину до 5,5 розчином 6 % хлоридної кислоти (від *ДР 1.3*). Загальний час кристалізації 12 годин. За рахунок постцпового зниження pH фермент кристалізується більш повно.

ТП 6.2. Відокремлення кристалічного осаду

Після кристалізації розчин ферменту за допомогою відцентрового насоса

(Н-31) подається у фільтруючу центрифугу (Ц-32), де здійснюється центрифугування при 3000 об/хв протягом 60 хв. При досягненні заданої товщини шару осаду подача суспензії автоматично припиняється, після чого відбуваються промивка осаду.

Фільтрат після центрифугування направляється на знешкодження відходів (*ЗВ 10.1*).

ТП 7. Приготування розчину препарату

ТП 7.1. Приготування розчину препарату

Утворений осад переносять у реактор-змішувач об'ємом 2 л (Р-33) та розчиняють в 1 л води для ін'єкцій при 30 °С. За допомогою pH-метра вирівнюють pH до 7 додаванням 50 мМ фосфорного буферу (pH 7) та додають попередньо простерилізовану наважку желатина як компонент захисного середовища для подальшої ліофілізації при 150 об/хв мішалки протягом 60 хв. При завершені процесу, проводять мікробіологічний контроль та інші тести.

ТП 7.2. Стерилізація розчину препарату

Готовий розчин проходить стадію холодної стерилізації за допомогою системи фільтрів з діаметром пор 0,45 мкм та 0,22 мкм. Потім розчином препарату наповнюють стерильні флакони в апараті для наповнення флаконів (АДН-34) які потім йдуть на етап ліофілізації.

ТП 8. Отримання ліофілізату

ТП 8.1. Заморожування препарату

Заморожування препарату у флаконах відбувається в стерильній сублімаційній сушарці (ЛС-35), створюється температура для заморожування, яка складає -47 ± 3° С, тривалість процесу складає 30-32 години.

ТП 8.2 Сублімаційне сушіння

Перед сушінням відкривають вакуумний вентиль, включають вакуумний насос і створюють в сушильній камері необхідний тиск (9 Па), відстежуючи його за показаннями вакуумметра.

За допомогою теплоносія поступово підіймають температуру в камері де знаходиться заморожений продукт до 40 ± 3° С, тривалість сушіння складає 25-30 годин. Після ліофільного висушування флакони передаються на стадію закупорювання. Ліофільне висушування проводиться в приміщенні класу А.

Після закінчення ліофільного висушування відбувається стадія охолодження флаконів в середині машини до температури 4-8 °С.

ПМВ 9. Пакування, маркування і відвантаження висушеної колагенази

ПМВ 9.1 Закупорювання

Флакони після ліофільного висушування передаються на апарат для закупорювання (ЗА-36). На флакон одягається гумова пробка та алюмінієва кришка, а також наноситься маркування. Після чого флакони переходять на стадію пакування.

ПМВ 9.2 Пакування

Флакони поступають на пакувальну машину, яка запаковує кожен флакон в окрему первину тару, в первину тару. Окрім флакону кладеться інструкція для застосування (лист-вкладиш). Після чого запакована партія відправляється в карантинну зону, де чекає рішення з її реалізації. Під час пакування в первину тару контролюється цілістність флаконів, якість нанесення етикетки, правельність і чіткість маркування, а також комплектність упаковки.

Отримавши рішення з реалізації утворена партія відравляється на конвеєр в якому оператори запаковують первину тару у вторину і відправляють на склад для реалізації.

ЗВ 10. Знешкодження відходів стадії виділення та очищення колагенази

ЗВ 10.1. Знешкодження рідких відходів виробництва колагенази

Рідкі відходи, що утворюються на *ТП 4.2, ТП 5.2* та *ТП 6.2* утилізуються в біотенках, де їх перетворення здійснюється за рахунок мікроорганізмів в складі активого мулу.

ЗВ 10.2. Знешкодження твердих відходів виробництва колагенази

Тверді відходи, що утворюються на *ТП 2.1* та *ТП 3.1* утилізуються за допомогою вторинної переробки (використані тари і браковані матеріали), а також за допомогою компостування (компоненти поживного середовища незадовільної якості і біомаса).

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

8.1. Показники якості готового продукту

8.1.1. Мікробіолгічний контроль

Мікробіологічний контроль реалізується шляхом висіву культури на чашки Петрі з агаризованими середовищами і наступним мікроскопіюванням. Цей процес включає кілька етапів для забезпечення точності та надійності результатів.

Спочатку відбирається проба культури, яку необхідно проаналізувати. Ця проба може бути взята з різних частин виробничого процесу, таких як ферментери або інші середовища.

Посіви здійснюють шляхом відбору 1 г сухої колагенази та розводять його в 9 мл дистильованої води. Отриманий розчин наносять на поверхню відповідного поживного середовища. Внесену пробу рівномірно розподіляють по поверхні середовища за допомогою стерильного шпателя Дригальського. Чашки з посівами завертають у папір і поміщають у термостат для інкубації при температурі 32-34 °С протягом 1-2 діб для МПА та при температурі 24-26 °С протягом 3-5 діб для СА.

На поверхні поживного середовища візуально визначають відсутність ознак росту сторонньої мікрофлори.

Аналіз проводиться в стерильних умовах в боксі. Посівний матеріал розподіляють по всій поверхні поживного середовища. Посіви на МПА інкубують при 35 °С, а на СА – 24 °С.

В 1 г препарату допустима наявність не більше 10^3 бактерій або 10^2 грибів, також не допускається наявність бактерій роду *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonasaeruginosa* та *Staphylococcusaureus* (Пирог, 2010).

8.1.2. Визначення колагеназної активності

Аналіз просоченого азобарвником колагену (Azocoll; Sigma Chemical Co., Сент-Луїс, Міссурі) проводили відповідно до модифікованої версії методу, розробленого Chavira та ін. (1984). Азокол промивали і суспендували в 0,05 М тріс-HCl буфері (pH 7,2), що містить 1 мМ $CaCl_2$, до кінцевої концентрації 0,5 % (мас./об.). Потім 150 мкл безклітинного фільтрату та 150 мкл буфера змішували з 270 мкл суспензії азоколу в реакційній пробірці на 2,0 мл. Реакційні пробірки інкубували при 37 °C на водяній бані при перемішуванні. Після 3 годин інкубації зразки охолоджували на льоду протягом 5 хвилин, щоб зупинити реакцію, і центрифугували при 10000 об/хв при 4 °C протягом 20 хв. Оптичну густину супернатанту вимірювали при 520 нм спектрофотометром UV-vis (модель B582; Micronal, Сан-Паулу, Бразилія). Одна одиниця активності ферменту (U) була визначена як кількість ферменту на мілілітр, яка призвела після 3 годин інкубації до збільшення поглинання на 0,1 при 520 нм через утворення розчинних пептидів, зв'язаних азодієлом (Lima та ін., 2014).

8.2. Контрольні точки виробництва колагенази

Таблиця 8.1

Карта постадійного контролю стадій ділянки виробництва колагенази

Номер контрольної точки та назва стадії	**Об'єкт контролю і показник, що визначається**	**Засоби та методи контролю**	**Періодичність перевірки та порядок відбору проб**	**Нормативна характеристика показника, що визначається**
1	*2*	*3*	*4*	*5*
ДР 1. Приготування допоміжних розчинів				
Кх 1.1 Приготування тріс-HCI буфера (50 мМ)	Концентрація буферного розчину	Хімічний метод	Концентрація визначається після приготування розчину	pH = 7,5 C= 0,05 М

Продовження таблиці 8.1

Кх 1.2 Приготування розчину $CaCl_2$ (20 мМ)	Концентрація розчину $CaCl_2$	Хімічний метод	Концентрація визначається після приготування розчину	pH = 7,5 C= 0,02 М
Кх 1.3 Приготування 6-% розчину HCl для етапу кристалізації	Концентрація розчину HCl	Хімічний метод	Концентрація визначається після приготування розчину	C = 6%
ТП 2. Стадії виробництва ЛЗ				
Кт 2.1 Центрифугування культуральної рідини	Культуральна рідина, частота обертання, час, температура	Годинник, датчик обертів, Термометр технічний	Під час процесу центрифугування	t = 5 ºС n=2600 об/хв τ =40 хв
Кт 3.1 Ультрафільтрація	Супернатант, температура, час, діаметр пор мембрани	Термометр технічний, годинник, перевірка діаметру пор згідно паспорту мембрани	Під час процесу ультрафільтрації	t = 5 ºС τ =80 хв, d пор = 2 нм
Кт 4.1 Осадження ферменту сульфатом амонію	Концентрат, концентрація сульфату амонію, температура, час	Термометр технічний, дозатор, годинник	Температура визначається під час осадження, концентрація сульфату амонію перед початком процесу	t = 5 ºС, C = 70% τ =16 год
Кт 4.2 Центрифугування для відділення осаду	Осад ферменту, частота обертання, час, температура	Годинник, датчик обертів, термометр технічний	Під час процесу центрифугування	t = 5 ºС, n=1940 об/хв τ =80 хв
Кт, Кх 5.1 Іонообмінна хроматографія	Елюат, pH, час, швидкість потоку	Датчик pH, годинник, система хроматографа	Під час процесу іонообмінної хроматографії	pH=7,5 τ = 2 год, V = 50 мл/хв

Закінчення таблиці 8.1

Кт, Кх 6.1 Кристалізація	Концентрат, концентрація поліетиленгліколь, температура, час, pH	Термометр технічний, дозатор, годинник, pH датчик	Температура, pH визначається під час кристалізації, концентрація поліетиленгліколю перед початком процесу	C= 15%, t = 18 ºC τ =7 днів pH = 7
Кт 6.2 Центрифугування для відділення осаду	Кристалічний осад ферменту, частота обертання, час, температура	Годинник, датчик обертів, температура	Під час процесу центрифугування	t = 5 ºC, n=3000 об/хв τ =30 хв
Кт 7.1 Приготування розчину препарату	Частота обертання, час, температура, pH	Термометр технічний, дозатор, годинник, pH датчик, датчик обертів	Під час процесу	t = 30 ºC, n=150 об/хв τ =60 хв, pH=7
Кт 7.2 Стерилізація розчину препарату	Час, діаметр пор мембрани	Годинник, перевірка діаметру пор згідно паспорту мембрани	Під час процесу	τ =60 хв, d пор = 0,22-0,45 мкм
Кт 8.1 Заморожування препарату	Температура заморожування, час	Термометр технічний, годинник	Під час заморожування	t=-47±3 ºC, τ = 30-32 год
Кт 8.2 Ліофільне сушіння	Температура, тривалість, тиск	Технічний термометр, годинник, манометр	Під час висушування	P=9 Па, t=40±3 ºC, τ = 25-30 год
Кт 9.2 Пакування	Кількість препарату	Ваги	Під час пакування	Цілістність флаконів, якість нанесення етикетки, правельність і чіткість маркування, а також комплектність упаковки

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Пирог, Т. П. Становлення та розвиток мікробіології / Т. П. Пирог // Загальна мікробіологія : підручник. - 2 вид., доп. і перероб. - Київ : НУХТ, 2010. - С. 6-20.

2. Abdel-Fattah, A. (2013). Production and partial characterization of collagenase from marine Nocardiopsis dassonvillei NRC2aza using chitin wastes. *Egyptian Pharmaceutical Journal*, *12*(2), 109. https://doi.org/10.4103/1687-4315.124003

3. Abidi, F., Aissaoui, N., Gaudin, J.-C., Chobert, J.-M., Haertlé, T., & Marzouki, M. N. (2013). MS Analysis and Molecular Characterization of Botrytis cinerea Protease Prot-2. Use in Bioactive Peptides Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *170*(2), 231–247. https://doi.org/10.1007/s12010-013-0186-2

4. Abidi, F., Aissaoui, N., Gaudin, JC. *et al.* (2013). MS Analysis and Molecular Characterization of *Botrytis cinerea* Protease Prot-2. Use in Bioactive Peptides Production. *Appl Biochem Biotechnol* **170**, 231–247. https://doi.org/10.1007/s12010-013-0186-2

5. Al-Bedak, O. A.-H. M., Moharram, A. M., Hussein, N. A.-G., Taha, D. M., Stephenson, S. L., & Ameen, F. (2023). Microbial Exploitation of Feather Wastes for Sustainable Production of Keratinase and Collagenase Enzymes by Didymella keratinophila AUMC 15399 in Submerged Fermentation. *Fermentation*, *9*(6), 507. https://doi.org/10.3390/fermentation9060507

6. Alipour, H., Raz, A., Zakeri, S., & Djadid, N. D. (2016). Therapeutic applications of collagenase (metalloproteases): A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *6*(11), 975-981.

7. Bajpai, P. (2014). Purification of Xylanases. *Xylanolytic Enzymes* (с. 53–61). https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801020-4.00006-8

8. Balan, S. S., Nethaji, R., Sankar, S. & Jayalakshmi, S. (2012). Production of gelatinase enzyme from *Bacillus spp* isolated from the sediment sample of Porto Novo Coastal sites. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1811-1816.

9. Batroukha, Y. A. F., Nour El Dein, M. M., Abou-Dobara, M. I., & El-Sayed, A. K. (2022). Production and Optimization of Gelatinase Producing *Lentzea sp*. Strain Isolated from the Soil Rhizosphere. *Scientific Journal for Damietta Faculty of Science*, *12*(1), 124-131.

10. Bernal, S. P. F., Gritti, M. A., dos Santos, V. P., Ottoni, J. R., de Oliveira, V. M., Peichoto, M. E., & Passarini, M. R. Z. (2021). Pharmaceutical biotechnological potential of filamentous fungi isolated from textile industry. *Archives of Microbiology*, *203*(7), 3933–3944. https://doi.org/10.1007/s00203-021-02379-3

11. Bhagwat, P. K., Bhise, K. K., Bhuimbar, M. V., & Dandge, P. B. (2018). Use of statistical experimental methods for optimization of collagenolytic protease production by Bacillus cereus strain SUK grown on fish scales. *Environmental Science and Pollution Research*, *25*(28), 28226–28236. https://doi.org/10.1007/s11356-018-2859-4

12. Blieva R. K., Suleimenova Zh. B., Zhakipbekova A. S., Kalieva A. K., Saduyeva Zh. K. & Rakhmetova Zh. K. (2019). Selection of optimal nutrient medium for collagenase biosynthesis by association *Aspergillus awamori* 16 and *Aspergillus awamori* 22. *Series of biological and medical*, *1*(331), 26–31. https://doi.org/10.32014/2019.251-1629.4

13. Bond, M.B. and Van Wart, H.E. (1984) Purification and separation of individual collagenases of CIostridium histolyticum using red dye ligand chromatography. Biochem. 23, 3077 3085

14. Branyikova, I., Prochazkova, G., Potocar, T., Jezkova, Z., & Branyik, T. (2018). Harvesting of Microalgae by Flocculation. *Fermentation*, *4*(4), 93. https://doi.org/10.3390/fermentation4040093

15. Brunengraber, L. N., Jayes, F. L., & Leppert, P. C. (2014). Injectable Clostridium histolyticum collagenase as a potential treatment for uterine fibroids. *Reproductive sciences*, *21*(12), 1452-1459.

16. Burtnick, M. N., Brett, P. J., & DeShazer, D. (2014). Proteomic analysis of the *Burkholderia pseudomallei* type II secretome reveals hydrolytic enzymes, novel proteins, and the deubiquitinase TssM. *Infection and immunity*, *82*(8), 3214–3226. https://doi.org/10.1128/IAI.01739-14

17. Chang, H. M., Hung, K. H., Hsu, C. C., Lin, T. C., & Chen, S. Y. (2015). Using induced pluripotent stem cell-derived conditional medium to attenuate the light-induced photodamaged retina of rats. *Journal of the Chinese Medical Association*, *78*(3), 169-176.

18. Chen, S., Ma, M., & Fu, X. (2020). Analyzing Structural and Functional Characteristics of Collagenase from *Bacillus cereus* MH19 via in silico Approaches. *Current Proteomics*, *17*(3), 200–212. https://doi.org/10.2174/1570164617666191004165609

19. Craig, L.C., & King, T.P. (2006). Dialysis. *Methods of Biochemical Analysis* (c. 175–199). John Wiley & Sons, Inc. https://doi.org/10.1002/9780470110270.ch6

20. Daboor, S. M., Budge, S. M., Ghaly, A. E., Brooks, M. S., & Dave, D. (2012). Isolation and activation of collagenase from fish processing waste. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, *3*(3), 191–203. https://doi.org/10.4236/abb.2012.33028

21. Daboor, S. M., Budge, S. M., Ghaly, A. E., Brooks, S. L., & Dave, D. (2010). Extraction and purification of collagenase enzymes: a critical review. *Am. J. Biochem. Biotechnol*, *6*(4), 239-263.

22. Daboor. (2010). Extraction and Purification of Collagenase Enzymes: A Critical Review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, *6*(4), 239–263. https://doi.org/10.3844/ajbbsp.2010.239.263

23. Delaissè, J.M., Y. Eeckhout, C. Sear, A. Galloway and K. McCullagh, et al., 1985. A new synthetic inhibitor of mammalian tissue collagenase inhibits bone resorption in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun*., 133: 483-490. DOI: 10.1016/0006- 291x(85)90932-5

24. Duarte, A. S., Correia, A., & Esteves, A. C. (2014). Bacterial collagenases – A review. *Critical Reviews in Microbiology*, *42*(1), 106–126. https://doi.org/10.3109/1040841x.2014.904270

25. Duarte, A. S., Correia, A., & Esteves, A. C. (2016). Bacterial collagenases–a review. *Critical Reviews in Microbiology*, *42*(1), 106-126.

26. Ducka, P., Eckhard, U., Schönauer, E., Kofler, S., Gottschalk, G., Brandstetter, H., & Nüss, D. (2009). A universal strategy for high-yield production of soluble and functional clostridial collagenases in E. coli. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *83*(6), 1055–1065. https://doi.org/10.1007/s00253-009-1953-4

27. Dutta, S., & Bose, K. (2022). Protein purification by affinity chromatography. In *Textbook on Cloning, Expression and Purification of Recombinant Proteins* (pp. 141-171). Singapore: Springer Nature Singapore.

28. Eckhard, U., Schönauer, E., Nüss, D., & Brandstetter, H. (2011). Structure of collagenase G reveals a chew-and-digest mechanism of bacterial collagenolysis. *Nature structural & molecular biology*, *18*(10), 1109–1114. https://doi.org/10.1038/nsmb.2127

29. Endo, A., Murakawa, S., Shimizu, H. and Shiraishi, Y. (1987) Purification and properties of collagenase from a Streptomyces species. J. Biochem. 102, 163-170.

30. Engstrand, C., Krevers, B., Nylander, G., & Kvist, J. (2014). Hand function and quality of life before and after fasciectomy for Dupuytren contracture. *The Journal of hand surgery*, *39*(7), 1333-1343.

31. Ferreira, C. M. O., Correia, P. C., Brandão-Costa, R. M. P., Albuquerque, W. W. C., Lin Liu, T. P. S., Campos-Takaki, G. M., & Porto, A. L. F. (2016).

Collagenase produced fromAspergillussp. (UCP 1276) using chicken feather industrial residue. *Biomedical Chromatography*, *31*(5), https://doi.org/10.1002/bmc.3882

32. Fields G. B. (2013). Interstitial collagen catabolism. *The Journal of biological chemistry*, *288*(13), 8785–8793. https://doi.org/10.1074/jbc.R113.451211

33. Garica, J. K., Mennan, C., Richardson, J., Wright, K., & Roberts, S. (2014). Cells isolated from fat pad and synovial fluid. are they suitable for cartilage repair?. *Osteoarthritis and Cartilage*, *22*, S445.

34. Gautam, M., & Azmi, W. (2017). Screening and isolation of collagenase producing microorganism from proteins waste found in Himalayan region. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, *4*(1), 558-565.

35. Gavira, J. A. (2016). Current trends in protein crystallization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *602*, 3–11. https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.12.010

36. Gillet, C., Y. Eeckhout and G. Vaes, 1977. Purification of procollagenase and collagenase by affinity chromatography on Sepharose-collagen. FEBS Lett., 74: 126-128. DOI: 10.1016/0014- 5793(77)80768-0

37. Graminho, E.R., da Silva, R.R., de Freitas Cabral, T.P. *et al.* (2013). Purification, Characterization, and Specificity Determination of a New Serine Protease Secreted by *Penicillium waksmanii* . *Appl Biochem Biotechnol*. **169**, 201–214. https://doi.org/10.1007/s12010-012-9974-3

38. Hamdy HS (2008). Extracellular collagenase from *Rhizoctonia solani*. Production , purification and characterization. *Indian J Biotechnol*. 7:333–40.

39. Haq, I.-u., ., H. M., ., Z. A., & ., N. R. (2004). Protease Biosynthesis by Mutant Strain of Penicillium griseoroseum and Cheese Formation. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, *7*(9), 1473–1476. https://doi.org/10.3923/pjbs.2004.1473.1476

40. Hatheway, C. L. (1990). Toxigenic clostridia. *Clinical microbiology reviews*, *3*(1), 66-98.https://diabetesatlas.com.ua/ua/v-ukrayini-2-mln-325-tys-lyudey-z-diabetom

41. Huang, M., Bai, Y., Sjostrom, S. L., Hallström, B. M., Liu, Z., Petranovic, D., ... & Nielsen, J. (2015). Microfluidic screening and whole-genome sequencing identifies mutations associated with improved protein secretion by yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(34), E4689-E4696.

42. Huch, M., Gehart, H., Van Boxtel, R., Hamer, K., Blokzijl, F., Verstegen, M. M., ... & Clevers, H. (2015). Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver. *Cell*, *160*(1), 299-312.

43. Huisman, I. H. (2000). MEMBRANE SEPARATIONS | Microfiltration. У *Encyclopedia of Separation Science* (с. 1764–1777). Elsevier. https://doi.org/10.1016/b0-12-226770-2/05251-0

44. Jhample S.B, Bhagwat P.K, Dandge P.B (2015). Statistical media optimization for enhanced production of fibrinolytic enzyme from newly isolated *Proteus penneri* SP-20. *Biocat Agri Biotechnol*, (4), 370-379.

45. Kahramanca, Þ., Kaya, O., Özgehan, G., Ýrem, B., Dural, Ý., Küçükpýnar, T., & Kargýcý, H. (2014). Are neutrophil-lymphocyte ratio and platelet-lymphocyte ratio as effective as Fournier's gangrene severity index for predicting the number of debridements in Fourner's gangrene?. *Turkish Journal of Trauma and Emergency Surgery*, *20*(2), 107-112.

46. Kanth, S. V., Venba, R., Madhan, B., Chandrababu, N. K., & Sadulla, S. (2008). *Studies on the influence of bacterial collagenase in leather dyeing. Dyes and Pigments, 76(2), 338–347.* doi:10.1016/j.dyepig.2006.08.043 https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-34548554341&origin=inward&txGid=a44d820fd1727f5b3a04b9c3e0dad43f

47. Kaur, A., Kaur, G., Reetu & Rai, M. P. (2022). Algae cultivation for biomedical applications: Current scenario and future direction. У *Algal Biotechnology* (с. 283–303). Elsevier. https://doi.org/10.1016/b978-0-323-90476-6.00009-1

48. Kegel, V., Deharde, D., Pfeiffer, E., Zeilinger, K., Seehofer, D., & Damm, G. (2016). Protocol for Isolation of Primary Human Hepatocytes and Corresponding

Major Populations of Non-parenchymal Liver Cells. *Journal of visualized experiments*, (109), e53069. https://doi.org/10.3791/53069

49. Kuypers, M. M. M., Marchant, H. K., & Kartal, B. (2018). The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology*, *16*(5), 263–276. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.9

50. Lambi, A. G., Popoff, S. N., Benhaim, P., & Barbe, M. F. (2023). Pharmacotherapies in Dupuytren Disease: Current and Novel Strategies. *The Journal of hand surgery*, *48*(8), 810–821. https://doi.org/10.1016/j.jhsa.2023.02.003

51. Lassen, K. M. K., Carcia de Caldeano, P. R. E., & Emborg, C. (1992). Methods for cell separation based on sedimentation. *Biotechnology Techniques*, *6*(2), 121–126. https://doi.org/10.1007/bf02438816

52. Li, J., Cheng, J.-H., Teng, Z.-J., Zhang, X., Chen, X.-L., Sun, M.-L., Wang, J.-P., Zhang, Y.-Z., Ding, J.-M., Tian, X.-M., & Zhang, X.-Y. (2022). A Novel Gelatinase from Marine *Flocculibacter collagenilyticus* SM1988: Characterization and Potential Application in Collagen Oligopeptide-Rich Hydrolysate Preparation. *Marine Drugs*, 20(1), 48. https://doi.org/10.3390/md20010048

53. Lima, C. A., Campos, J. F., Filho, J. L. L., Converti, A., da Cunha, M. G. C., & Porto, A. L. F. (2014). Antimicrobial and radical scavenging properties of bovine collagen hydrolysates produced by *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622 collagenase. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(7), 4459–4466. https://doi.org/10.1007/s13197-014-1463-y

54. Lima, C. A., Campos, J. F., Filho, J. L., Converti, A., da Cunha, M. G., & Porto, A. L. (2015). Antimicrobial and radical scavenging properties of bovine collagen hydrolysates produced by Penicillium aurantiogriseum URM 4622 collagenase. *Journal of food science and technology*, *52*(7), 4459–4466. https://doi.org/10.1007/s13197-014-1463-y

55. Lima, C. A., Viana Marques, D. A., Neto, B. B., Lima Filho, J. L., Carneiro-da-Cunha, M. G., & Porto, A. L. F. (2011). Fermentation medium for

collagenase production by *Penicillium aurantiogriseum* URM4622. *Biotechnology Progress*, *27*(5), 1470–1477. https://doi.org/10.1002/btpr.664

56. Lima, C. A., Filho, J. L. L., Neto, B. B., Converti, A., Carneiro da Cunha, M. G., & Porto, A. L. F. (2011). Production and characterization of a collagenolytic serine proteinase by Penicillium aurantiogriseum URM 4622: A factorial study. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *16*(3), 549–560. https://doi.org/10.1007/s12257-010-0247-0

57. Lima, C. A., Rodrigues, P. M. B., Porto, T. S., Viana, D. A., Lima Filho, J. L., Porto, A. L. F., & Carneiro da Cunha, M. G. (2009). Production of a collagenase from Candida albicans URM3622. *Biochemical Engineering Journal*, *43*(3), 315–320. https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.10.014

58. Liu, X., and Kokare, C., Eds. (2017). Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications. pp. 267–298, *Academic Press Books*, Elsevier

59. Maimets, M., Bron, R., de Haan, G., van Os, R., & Coppes, R. P. (2015). Similar ex vivo expansion and post-irradiation regenerative potential of juvenile and aged salivary gland stem cells. *Radiotherapy and Oncology*, *116*(3), 443-448.

60. Makinen, K.K. and Makinen, P-L. (1987) Purification and properties of an extracellular collagenolytic protease produced by the human oral bacterium Bacillus cereus. J. Biol. Chem. 262, 12488-12495.

61. Martin-Ferrero, M. (2014). Ten-year long-term results of total joint arthroplasties with ARPE® implant in the treatment of trapeziometacarpal osteoarthritis. *Journal of Hand Surgery (European Volume)*, *39*(8), 826-832.

62. Matsushita O, Yoshihara K, Katayama S, et al. (1994). Purification and characterization of Clostridium perfringens 120-kilodalton collagenase and nucleotide sequence of the corresponding gene. J Bacteriol 176:149–56.

63. McCallon, S. K., Weir, D., & Lantis II, J. C. (2014). Optimizing wound bed preparation with collagenase enzymatic debridement. *Journal of the American College of Clinical Wound Specialists*, *6*(1-2), 14-23.

64. McCroskery, P.A., J.F. Richards and E.D.J. Harris, 1975. Purification and characterization of a collagenase extracted from rabbit tumours. *Biol. J.*, 152: 131-142. PMCID: PMC1172448

65. Meghwanshi, G. K., Kaur, N., Verma, S., Dabi, N. K., Vashishtha, A., Charan, P. D., Purohit, P., Bhandari, H. S., Bhojak, N., & Kumar, R. (2020). Enzymes for pharmaceutical and therapeutic applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, *67*(4), 586–601. https://doi.org/10.1002/bab.1919

66. Mohseni, S., Moghadam, T. T., Dabirmanesh, B., & Khajeh, K. (2016). Expression, purification, refolding and in vitro recovery of active full length recombinant human gelatinase MMP-9 in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 126, 42–48. https://doi.org/10.1016/j.pep.2016.04.015

67. Morgan, C. A., Herman, N., White, P. A., & Vesey, G. (2006). Preservation of micro-organisms by drying; A review. *Journal of Microbiological Methods*, *66*(2), 183–193. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017

68. Motley, T. A., Lange, D. L., Dickerson Jr, J. E., & Slade, H. B. (2014). Clinical outcomes associated with serial sharp debridement of diabetic foot ulcers with and without clostridial collagenase ointment. *Wounds*, *26*(3), 57-64.

69. Najjar, Y. S. H., & Abu-Shamleh, A. (2020). Harvesting of microalgae by centrifugation for biodiesel production: A review. *Algal Research*, *51*, 102046. https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102046

70. Ndikubwimana, T., Chang, J., Xiao, Z., Shao, W., Zeng, X., Ng, I.-S., & Lu, Y. (2016). Flotation: A promising microalgae harvesting and dewatering technology for biofuels production. *Biotechnology Journal*, *11*(3), 315–326. https://doi.org/10.1002/biot.201500175

71. Noble, J., Heathcote, J. G., & Cohen, H. (1984). Diabetes mellitus in the

aetiology of Dupuytren's disease. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, *66*(3), 322–325. https://doi.org/10.1302/0301-620X.66B3.6725338

72. Ó'Fágáin, C. (2004). Lyophilization of Proteins. In: Cutler, P. (eds) Protein Purification Protocols. *Methods in Molecular Biology*, vol 244. Humana Press. https://doi.org/10.1385/1-59259-655-X:309

73. Ohbayashi N, Matsumoto T, Shima H, Goto M, Watanabe K, Yamano A, Katoh Y, Igarashi K, Yamagata Y & Murayama K (2013) Solution structure of clostridial collagenase H and its calcium-dependent global conformation change, Biophys J. 104, 1538–45

74. Ohbayashi, N., Yamagata, N., Goto, M., Watanabe, K., Yamagata, Y., & Murayama, K. (2012). Enhancement of the structural stability of full-length clostridial collagenase by calcium ions. *Applied and environmental microbiology*, *78*(16), 5839–5844. https://doi.org/10.1128/AEM.00808-12

75. Ohyama, H. and K. Hashimoto, 1977. Collagenase of human skin basal cell epithelioma. Biochemistry, 82: 175-183. ISSN: 1756-2651

76. Oliveira, V. d. M., Cunha, M. N. C. d., Assis, C. R. D., Nascimento, T. P., Herculano, P. N., Cavalcanti, M. T. H., & Porto, A. L. F. (2017). Colagenases do pescado e suas aplicações industriais. *Pubvet*, *11*(3), 243–255. https://doi.org/10.22256/pubvet.v11n3.243-255

77. Pal G.K, Suresh P.V (2016). Microbial collagenases: challenges and prospects in production and potential applications in food and nutrition. *RSC Adv*, (6), 33763-33780.

78. Park, B. R., Zielke, R. A., Wierzbicki, I. H., Mitchell, K. C., Withey, J. H., & Sikora, A. E. (2015). A metalloprotease secreted by the type II secretion system links Vibrio cholerae with collagen. *Journal of bacteriology*, *197*(6), 1051–1064. https://doi.org/10.1128/JB.02329-14

79. Patel, A. K., Singhania, R. R., Pandey, A., Eds. (2017). Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications. pp. 13–41,

Academic Press Books

80. Peimer, C. A., Blazar, P., Coleman, S., Kaplan, F. T. D., Smith, T., & Lindau, T. (2015). Dupuytren contracture recurrence following treatment with collagenase clostridium histolyticum (CORDLESS [Collagenase Option for Reduction of Dupuytren Long-Term Evaluation of Safety Study]): 5-year data. *The Journal of hand surgery*, *40*(8), 1597-1605.

81. Pequeno, A. C. L., Arruda, A. A., Silva, D. F., Duarte Neto, J. M. W., Silveira Filho, V. M., Converti, A., Marques, D. A. V., Porto, A. L. F., & Lima, C. A. (2019). Production and characterization of collagenase from a new Amazonian *Bacillus cereus* strain. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, *49*(5), 501–509. https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1587627

82. Popoff, M. R. (2015). From saprophytic to toxigenic clostridia, a complex evolution based on multiple diverse genetic transfers and/or rearrangements. *Research in Microbiology*, *166*(4), 221–224. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.02.008

83. Preet Kaur, S., & Azmi, W. (2013). Cost Effective Production of a Novel Collagenase from a Non-Pathogenic Isolate Bacillus tequilensis. *Current Biotechnology*, *2*(1), 17–22. https://doi.org/10.2174/2211550111302010004

84. Rashaan, Z. M., Krijnen, P., Klamer, R. R., Schipper, I. B., Dekkers, O. M., & Breederveld, R. S. (2014). Nonsilver treatment vs. silver sulfadiazine in treatment of partial-thickness burn wounds in children: a systematic review and meta-analysis. *Wound Repair and Regeneration*, *22*(4), 473-482.

85. Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. (2012). MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. Nucleic Acids Res 40:

86. Revankar, A. G., Bagewadi, Z. K., Ahmed Shaikh, I., Dhananjaya, G., Mahanta, N., Abdullatif Khan, A., Bochageri, N. P., & Abdulaziz Mannasaheb, B. (2024). Molecular analysis of recombinant collagenase from Bacillus siamensis strain Z1: Gene Cloning, expression and in-silico characterization. *Arabian Journal of Chemistry*, 105942. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2024.105942

87. Rochima, E., Sekar, N., Buwono, I. D., Afrianto, E., & Pratama, R. I. (2016). Isolation and Characterization of Collagenase from *Bacillus Subtilis* (Ehrenberg, 1835); ATCC 6633 for Degrading Fish Skin Collagen Waste from Cirata Reservoir, Indonesia. *Aquatic Procedia*, *7*, 76–84. https://doi.org/10.1016/j.aqpro.2016.07.010

88. Rosso, B. U., Lima, C. d. A., Porto, T. S., de Oliveira Nascimento, C., Pessoa, A., Converti, A., Carneiro-da-Cunha, M. d. G., & Porto, A. L. F. (2012). Partitioning and extraction of collagenase from Penicillium aurantiogriseum in poly(ethylene glycol)/phosphate aqueous two-phase system. *Fluid Phase Equilibria*, *335*, 20–25. https://doi.org/10.1016/j.fluid.2012.05.030

89. Sai-Ut, S., Benjakul, S., Sumpavapol, P., & Kishimura, H. (2014). Optimization of gelatinolytic enzyme production by *B. amyloliquefaciens sp*. H11 through Plackett–Burman design and response surface methodology. *International Aquatic Research*, 6(1). https://doi.org/10.1007/s40071-014-0059-5

90. Sakamoto, S., P. Goldhaber and M.J. Glimcher, 1972. The further purification and characterization of mouse bone collagenase. *Calcified Tissiue Res*., 10: 142-151. DOI: 10.1007/BF02012544

91. Schönauer, E., Kany, A. M., Haupenthal, J., Hüsecken, K., Hoppe, I. J., Voos, K., Yahiaoui, S., Elsässer, B., Ducho, C., Brandstetter, H., & Hartmann, R. W. (2017). Discovery of a Potent Inhibitor Class with High Selectivity toward Clostridial Collagenases. *Journal of the American Chemical Society*, *139*(36), 12696–12703. https://doi.org/10.1021/jacs.7b06935

92. Sharkova, T. S., Kurakov, A. V., Osmolovskiy, A. A., Matveeva, E. O., Kreyer, V. G., Baranova, N. A., & Egorov, N. S. (2015). Screening of producers of proteinases with fibrinolytic and collagenolytic activities among micromycetes. *Microbiology*, *84*(3), 359–364. https://doi.org/10.1134/s0026261715030182

93. Sharp, N. E., Aguayo, P., Marx, D. J., Polak, E. E., Rash, D. E., Peter, S. D., ... & Juang, D. (2014). Nursing preference of topical silver sulfadiazine versus

collagenase ointment for treatment of partial thickness burns in children: survey follow-up of a prospective randomized trial. *Journal of Trauma Nursing| JTN*, *21*(5), 253-257.

94. Shekhter, A. B., Balakireva, A. V., Kuznetsova, N. V., Vukolova, M. N., Litvitsky, P. F., & Zamyatnin, A. A., Jr (2019). Collagenolytic Enzymes and their Applications in Biomedicine. *Current medicinal chemistry*, *26*(3), 487–505. https://doi.org/10.2174/0929867324666171006124236

95. Shoari, A. (2024). Potential of MMP-2 and MMP-9 Gelatinase Blockade as a Therapeutic Strategy in Fibrosarcoma Treatment: A Decadal Review. *Targets*, *2*(2), 104–125. https://doi.org/10.3390/targets2020007Soria-Valles, C., Gutiérrez-Fernández, A., Guiu, M., Mari, B., Fueyo, A., Gomis, R. R., & López-Otín, C. (2014). The anti-metastatic activity of collagenase-2 in breast cancer cells is mediated by a signaling pathway involving decorin and miR-21. *Oncogene*, *33*(23), 3054-3063.

96. Silva, D. F. d., de Souza, E. P., Porto, A. L. F., Silva, A. B. d., Simas Teixeira, M. F., Duarte Neto, J. M. W., Converti, A., Marques, D. d. A. V., & Lima Duarte, C. d. A. (2022). First report of collagenase production by *Trichosporon* sp. strain isolated from pollen of Amazonian bee (*Melipona seminigra seminigra*). *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 1–9. https://doi.org/10.1080/10826068.2022.2028637

97. Siqueira, A. C. R. d., Rosa, N. G. d., Motta, C. M. S., & Cabral, H. (2014). Peptidase with Keratinolytic Activity Secreted by Aspergillus terreus During Solid-State Fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *57*(4), 514–522. https://doi.org/10.1590/s1982-88372014000100008

98. Sivakumar, P., P. Sampath and G. Chandrakasan, 1999. Collagenolytic metalloprotease (gelatinase) from the hepatopancreas of the marine crab, Scylla serrata. *Comparative Biochem. Physiol*., 123: 273- 279. DOI: 10.1016/S0305-0491(99)00067-X

99. Song, Y., Fu, Y., Huang, S., Liao, L., Wu, Q., Wang, Y., ... & Fang, B. (2021). Identification and antioxidant activity of bovine bone collagen-derived novel

peptides prepared by recombinant collagenase from Bacillus cereus. *Food Chemistry*, *349*, 129143.

100. Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (2017). The recovery and purification of fermentation products. *Principles of Fermentation Technology* (c. 619–686). https://doi.org/10.1016/b978-0-08-099953-1.00010-7

101. Starkweather, K. D., Lattuga, S., Hurst, L. C., Badalamente, M. A., Guilak, F., Sampson, S. P., Dowd, A., & Wisch, D. (1996). Collagenase in the treatment of Dupuytren's disease: An in vitro study. *The Journal of Hand Surgery*, *21*(3), 490–495. https://doi.org/10.1016/s0363-5023(96)80368-6

102. Stokes, M. A. R., & Johnson, W. D. (2017). Burns in the Third World: an unmet need. *Annals of burns and fire disasters*, *30*(4), 243.

103. Stolow, M.A., Bauzon, D.D., Li, J., Sedgwick, T., Liang, V.C.-T., Sang, Q.A., Shi, Y.-B. (1996). Identification and characterization of a novel collagenase in *Xenopus laevis*: possible roles during frog development. *Mol. Biol. Cell 7*, 1471-1483.

104. Swarnakar, S., Mishra, A., & Chaudhuri, S. R. (2012). The Gelatinases and Their Inhibitors: The Structure–Activity Relationships. *Matrix Metalloproteinase Inhibitors*, 57–82. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0364-9_3

105. Syed, F., Thomas, A. N., Singh, S., Kolluru, V., Emeigh Hart, S. G., & Bayat, A. (2012). In vitro study of novel collagenase (XIAFLEX®) on Dupuytren's disease fibroblasts displays unique drug related properties. *PloS one*, *7*(2), e31430.

106. Tamagno, G., Vigolo, S., Olivieri, M., Martini, C., & De Carlo, E. (2014). From the rat to the beta cell: a fast and effective technique of separation of Langerhans islets and direct purification of pancreatic beta cells. *Endocrine research*, *39*(1), 18–21. https://doi.org/10.3109/07435800.2013.797430

107. Tanaka, K., Okitsu, T., Teramura, N., Iijima, K., Hayashida, O., Teramae, H., & Hattori, S. (2020). Recombinant collagenase from Grimontia hollisae as a tissue dissociation enzyme for isolating primary cells. *Scientific Reports*, *10*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-020-60802-z

108. Tanaka, K., Teramura, N., Hayashida, O., Iijima, K., Okitsu, T., & Hattori, S. (2018). The C-terminal segment of collagenase in Grimontia hollisae binds collagen to enhance collagenolysis. *FEBS Open Bio*, *8*(10), 1691–1702. https://doi.org/10.1002/2211-5463.12510

109. Teramura, N., Tanaka, K., Iijima, K., Hayashida, O., Suzuki, K., Hattori, S., & Irie, S. (2011). Cloning of a novel collagenase gene from the gram-negative bacterium Grimontia (Vibrio) hollisae 1706B and its efficient expression in Brevibacillus choshinensis. *Journal of bacteriology*, *193*(12), 3049-3056.

110. Tuohetahuntila, M., Spee, B., Kruitwagen, H. S., Wubbolts, R., Brouwers, J. F., van de Lest, C. H., ... & Vaandrager, A. B. (2015). Role of long-chain acyl-CoA synthetase 4 in formation of polyunsaturated lipid species in hepatic stellate cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1851*(2), 220-230.

111. Viani, F. C., Cazares Viani, P. R., Gutierrez Rivera, I. N., da Silva, É. G., Paula, C. R., & Gambale, W. (2007). Actividad proteolítica extracelular y análisis molecular de cepas de Microsporum canis aisladas de gatos con y sin sintomatología. *Revista Iberoamericana de Micología*, *24*(1), 19–23. https://doi.org/10.1016/s1130-1406(07)70004-9

112. Waibel, J. S., Mi, Q. S., Ozog, D., Qu, L., Zhou, L., Rudnick, A., ... & Mordon, S. (2016). Laser-assisted delivery of vitamin C, vitamin E, and ferulic acid formula serum decreases fractional laser postoperative recovery by increased beta fibroblast growth factor expression. *Lasers in surgery and medicine*, *48*(3), 238-244.

113. Wanderley, M. C. d. A., Duarte Neto, J. M. W., Andrade, A. F. d., Melo, R. G. d., Viana-Marques, D. d. A., Bezerra, R. P., & Porto, A. L. F. (2020). First report on Chlorella vulgaris collagenase production and purification by aqueous two-phase system. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, *15*, 100202. https://doi.org/10.1016/j.scp.2019.100202

114. Wanderley, M. C. d. A., Neto, J. M. W. D., Filho, J. L. d. L., Lima, C. d. A., Teixeira, J. A. C., & Porto, A. L. F. (2017). Collagenolytic enzymes produced by fungi: a systematic review. *Brazilian Journal of Microbiology*, *48*(1), 13–24. https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.08.001

115. Weinberg, M, Randin A. (1932). Proprietes physicochimiques du ferment fibrolytique d'origine microbienne. Compt Rend Soc Biol 110:352.

116. Wu, Q., Li, C., Li, C., Chen, H., & Shuliang, L. (2009). Purification and Characterization of a Novel Collagenase from Bacillus pumilus Col-J. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *160*(1), 129–139. https://doi.org/10.1007/s12010-009-8673-1

117. Xiao, H., Liu, X., Feng, Y., Zheng, L., Zhao, M., & Huang, M. (2022). Secretion of collagenases by Saccharomyces cerevisiae for collagen degradation. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, *15*(1). https://doi.org/10.1186/s13068-022-02186-y

118. Yang, H., Li, J., Du, G., and Liu, L., Eds. (2017). Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications. pp. 151–165, *Academic Press Books*, Elsevier.

119. Yuivar, Y., Alcaino, J., Cifuentes, V., & Baeza, M. (2019). Characterization of gelatinase produced by AntarcticMrakiasp. *Journal of Basic Microbiology*, *59*(8), 846–852. https://doi.org/10.1002/jobm.201900126

120. Zhang, D., Zhang, Y., Wang, Z., Zhang, X., & Sheng, M. (2015). Target radiofrequency combined with collagenase chemonucleolysis in the treatment of lumbar intervertebral disc herniation. *International journal of clinical and experimental medicine*, *8*(1), 526.

121. Zhu, Y., Wang, L., Zheng, K., Liu, P., Li, W., Lin, J., Liu, W., Shan, S., Sun, L., & Zhang, H. (2022). Optimized Recombinant Expression and Characterization of Collagenase in Bacillus subtilis WB600. *Fermentation*, *8*(9), 449. https://doi.org/10.3390/fermentation8090449