

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

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

«До захисту в ЕК»

Декан факультету

Наталія ГРЕГІРЧАК

(підпис)

(ім'я та прізвище)

« » червня 2025 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Віктор СТАБНИКОВ

(підпис)

(ім'я та прізвище)

« » червня 2025 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична,

промислова, харчова, природоохоронна»

на тему: Одержання колагенази культивуванням *Bacillus megaterium*

Виконала: здобувачка IV курсу, групи 1

ПАРХОМОВА Олександра Олександрівна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник КРАСІНЬКО Вікторія Олегівна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Рецензент

Оксана БОНДАРЕНКО

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Я, як здобувачка Національного університету харчових технологій, розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавала і не одержувала недозволеної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувач

(підпис)

Київ – 2025 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь: бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнології: фармацевтична,

промислова, харчова, природоохоронна»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

« 01 » березня 2025 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ПАРХОМОВІЙ Олександрі Олександрівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Одержання колагенази культивуванням *Bacillus megaterium*

керівник роботи КРАСІНЬКО Вікторія Олегівна, к.т.н., доц.

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від « 27 » березня 2025 року № 188-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 28 травня 2025 р.

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Bacillus megaterium* КМ 369985;
цільовий продукт: колагеназа; геометричний об'єм ферментера: 0,15 м³; коефіцієнт
заповнення: 0,6

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)
Характеристика цільового продукту; обґрунтування вибору та характеристика
біологічного агента; техніко-економічне обґрунтування; біосинтез цільового
продукту; обґрунтування вибору технологічної схеми; специфікація обладнання;
опис технологічної схеми; основні етапи виділення та очищення цільового
продукту; контроль виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу технологічна схема біосинтезу ферменту
колагенази – 1 аркуш формату А1, апаратурна схема біосинтезу ферменту
колагенази – 1 аркуш формату А1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01.03.2025 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

Пор. №	Назва етапів виконання проекту (роботи)	Термін виконання етапів проекту (роботи)	Примітка
1	Характеристика цільового продукту	01.03.2025 – 09.03.2025	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	10.03.2025 – 16.03.2025	
3	Техніко-економічне обґрунтування	17.03.2025 – 23.03.2025	
4	Біосинтез цільового продукту	24.03.2025 – 31.03.2025	
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми	01.04.2025 – 06.04.2025	
6	Специфікація обладнання	07.04.2025 – 13.04.2025	
7	Опис технологічної схеми	14.04.2025 – 20.04.2025	
8	Основні етапи виділення та очищення цільового продукту	21.04.2025 – 04.05.2025	
9	Контроль виробництва	05.05.2025 – 11.05.2025	
10	Оформлення графічної частини	12.05.2025 – 18.05.2025	
11	Оформлення кваліфікаційної роботи	19.05.2025 – 28.05.2025	

Здобувач

(підпис)

Олександра ПАРХОМОВА

(ім'я та прізвище)

Керівник роботи

(підпис)

Вікторія КРАСІНЬКО

(ім'я та прізвище)

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	7
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	9
ВСТУП.....	10
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА КОЛАГЕНАЗИ.....	12
1.1. Фізико-хімічні властивості колагенази.....	13
1.2. Механізм дії ферменту колагенази.....	15
1.3. Отримання ферменту колагенази.....	17
1.4. Сфери застосування ферменту колагенази.....	18
РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	20
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	20
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента <i>Bacillus megaterium</i> КМ 369985.....	28
2.3. Таксономічний статус біологічного агента <i>Bacillus megaterium</i> КМ 369985..	31
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО - ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ.....	32
3.1. Потреба у ферменті колагенази	32
3.2. Розрахунок потужності виробництва ферменту колагенази.....	34
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів для біосинтезу колагенази.....	36
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу колагенази бактеріями <i>B. megaterium</i> КМ 369985.....	37
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ФЕРМЕНТУ КОЛАГЕНАЗИ.....	40
4.1. Шляхи катаболізму глюкози у біологічного агента <i>Bacillus megaterium</i> КМ 369985.....	40
4.2. Біотрансформація глюкози у фермент колагеназу.....	43
РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	50
5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	50
5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.....	53

5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва ферменту колагенази бактеріями <i>Bacillus megaterium</i> КМ 369985.....	57
5.3.1. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів.....	58
5.3.2. Розрахунок витрат мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва ферменту колагенази бактеріями <i>Bacillus megaterium</i> КМ 369985.....	65
5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	68
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ВИРОБНИЧОГО ОБЛАДНАННЯ.....	76
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ФЕРМЕНТУ КОЛАГЕНАЗИ БАКТЕРІЯМИ <i>BACILLUS MEGATERIUM</i> КМ 369985.....	79
РОЗДІЛ 8. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ФЕРМЕНТУ КОЛАГЕНАЗИ	88
8.1. Отримання супернатанту методом центрифугування.....	88
8.2. Концентрування та очищення супернатанту ультрафільтрацією	89
8.3. Слабка аніонообмінна хроматографія.....	90
8.4. Концентрування та очищення розчину колагенази ультрафільтрацією.....	92
8.5. Сильна аніонообмінна хроматографія.....	92
8.6. Фінальне концентрування розчину колагенази методом ультрафільтрації.....	93
8.7. Сублімаційне сушіння ферменту колагенази.....	94
8.8. Подрібнення, просіювання та фасування субстанції.....	95
РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ФЕРМЕНТУ КОЛАГЕНАЗИ БАКТЕРІЯМИ <i>BACILLUS MEGATERIUM</i> КМ 369985.....	98
9.1. Мікробіологічний контроль поживного середовища та посівного матеріалу <i>B. megaterium</i> КМ 369985.....	98
9.2. Показники росту і синтезу ферменту колагенази.....	101
9.2.1. Визначення концентрації біомаси <i>B. megaterium</i> КМ 369985.....	101
9.2.2. Визначення активності ферменту колагенази у культуральній рідині..	102
9.2.3. Визначення загальної кількості білка у культуральній рідині	104
9.2.4. Визначення концентрації джерела вуглецю.....	107

9.2.5. Визначення концентрації джерела азоту.....	109
ВИСНОВКИ.....	112
ЛІТЕРАТУРА.....	114
ДОДАТКИ.....	125

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню технологічної та апаратурної схеми біосинтезу протеолітичного ферменту колагенази, що синтезується бактеріями *Bacillus megaterium* КМ 369985, в процесі росту на середовищі простого складу синтезує фермент з активністю 600 од/мл, що перевищує показники інших відомих продуцентів. Колагеназа демонструє високу ефективність при застосуванні у вигляді ін'єкційного лікарського засобу для терапії шкірних рубців, утворених внаслідок хімічних, термічних або механічних ушкоджень. На основі аналізу сучасних наукових джерел та з використанням актуальних баз даних було здійснено розрахунок річної виробничої потужності - 1,671 м³ культуральної рідини.

Технологія біосинтезу колагенази передбачає виконання низки допоміжних операцій: підготовка повітря для аерації в процесі отримання інокуляту та культуральної рідини, оскільки біологічний агент – аероб, а також приготування та стерилізацію поживних середовищ, де специфічним компонентом є колаген – індуктор синтезу колагенази. Технологічний процес складається з: отримання інокуляту (в качалочних колбах, та інокуляторі – 15 л) та безпосередньо виробничий біосинтез з використанням біореактору – 150 л, (0,6 – коефіцієнт заповнення). З метою забезпечення максимальної ефективності процесу біосинтезу ферменту колагенази, культивування проводили періодично, глибинним способом з аерацією при температурі 37°C, 72 год. Особливу увагу приділено вибору мийних і дезінфікуючих засобів, що відповідають суворим вимогам, які висуваються до санітарної обробки біотехнологічного виробництва та гігієни персоналу. Наведено деталізовану схему виділення та багатоетапного очищення ферменту колагенази, а також описані методи контролю показників росту та синтезу цільового продукту.

Кваліфікаційна робота складається з вступу, дев'яти розділів, висновків, списку використаної літератури (96 найменувань), 3 додатків, технологічної (1 аркуш формату А1) та апаратурної (1 аркуш формату А1) схем. Загальний обсяг роботи - 141 сторінка, 16 - рисунків та 17 - таблиць.

Ключові слова: *B. megaterium* КМ 369985, ін'єкційний препарат колагенази, лікування рубців, колаген, культивування, виділення.

ABSTRACT

The qualification thesis is dedicated to the development of the technological and equipment scheme for the biosynthesis of the proteolytic enzyme collagenase, produced by *Bacillus megaterium* KM 369985. When cultivated in a simple medium, this strain synthesizes the enzyme with an activity of 600 U/mL, which exceeds the performance of other known producers. Collagenase demonstrates high efficacy when used as an injectable pharmaceutical agent for the treatment of skin scars resulting from chemical, thermal, or mechanical injuries. Drawing on the review of current scientific literature and using up-to-date databases, the annual production capacity was calculated to be 1.671 m³ of culture fluid.

The technology for collagenase biosynthesis involves a series of auxiliary operations, including air preparation for aeration during inoculum development and production-scale biosynthesis, since the microorganism is an aerobe. It also includes the preparation and sterilization of growth media, with collagen—a specific inducer of collagenase synthesis—serving as a key component. The bioprocess includes two inoculum development stages (in shake flasks and a 0.015 m³ seed fermenter) followed by large-scale fermentation in a 0.15 m³ bioreactor, operated at a fill volume coefficient of 0.6. To ensure maximum efficiency of the collagenase biosynthesis process, cultivation was carried out in batch mode using a submerged technique with aeration at 37°C for 72 hours. Particular attention was paid to the selection of cleaning and disinfecting agents that meet strict standards for sanitary processing in biotechnological production and personal hygiene. A detailed scheme for the extraction and multistep purification of collagenase is presented, along with descriptions of the methods used to monitor cell growth and the synthesis of the target product.

The qualification thesis consists of an introduction, nine chapters, conclusions, a list of references (96 sources), three appendices, a technological flow diagram (1 sheet, A1 format), and an equipment layout diagram (1 sheet, A1 format). The total volume of the work is 141 pages, including 16 figures and 17 tables.

Keywords: *B. megaterium* KM 369985, injectable collagenase formulation, scar treatment, collagen, cultivation, extraction.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

EC code	Enzyme Commission code
ECM	extracellular matrix
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
КФ	класифікація ферментів
ЦТК	цикл трикарбонних кислот
МПА	м'ясо-пептонний агар
СА	сусло-агар
ЕДТА	етилендіамінтетраоцтова кислота

ВСТУП

Біотехнологія є однією з найперспективніших галузей, що перебуває у фазі активного розвитку, який зумовлений значним науково-технічним потенціалом країн та їхнім прагненням використовувати біологічні процеси для вирішення складних завдань у межах промислових технологічних процесів. Серед численних напрямів сучасної біотехнології особливе значення надається розробці та вдосконаленню ферментних препаратів — біологічно активних білкових молекул, які виступають каталізаторами специфічних біохімічних реакцій, які активно використовуються в харчовій, фармацевтичній, текстильній, шкіряній промисловості, а також у медицині, агропромисловому комплексі, тонкому органічному синтезі та екологічних технологіях, включаючи очищення промислових і побутових стічних вод. [1,2]

Ферментативні процеси демонструють високий потенціал у сфері створення новітніх лікарських засобів та терапевтичних підходів, відкриваючи перспективи для ефективного використання для усунення широкого кола патологій. Суттєву роль ферменти відіграють при розробці біосенсорних систем для діагностики захворювань, включаючи онкологічні стани, у реалізації ензимотерапії, спрямованої на корекцію генетичних порушень, а також у виробництві біологічних препаратів, які поступово витісняють традиційні хімічні лікарські засоби через їхню нижчу ймовірність спричинення побічних реакцій. [2]

Сучасна біотехнологія виявляє значний науково-практичний інтерес до ферментів, здатних селективно впливати на ключові компоненти позаклітинного матриксу, зокрема білки сполучної тканини, що забезпечують структурно-функціональний каркас більшості біологічних тканин. До прикладу, колаген – це білок фібрилярної природи, який бере участь у формуванні тканинного каркаса, збереженні еластичних властивостей і процесах регенерації.. Патологічні зміни структури або надмірна акумуляція колагену є характерними ознаками таких

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.31 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Пархомова О.О.</i>			<i>Вступ</i>	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Красінько В.О.</i>					10	141
<i>Консультант</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

процесів, як фіброз та гіпертрофічні рубці. У цьому контексті розробка біотехнологічних препаратів на основі колагенолітичних ферментів, що забезпечують селективну деградацію патологічно змінених колагенових структур без порушення здорових тканин, набуває особливої **актуальності**. [3]

Впровадження колагенази в медичну практику зумовлене її високою терапевтичною ефективністю при лікуванні опікових ушкоджень та асоційованих рубцевих деформацій. Традиційні методи — охолодження, антисептики, протизапальні засоби — є доцільними на ранніх етапах загоєння, проте не запобігають формуванню гіпертрофічної рубцевої тканини. Колагеназа, завдяки вираженій активності та низькій токсичності при підвищених концентраціях, все ж таки вважається перспективним засобом у терапії важких постопікових ускладнень. Зростання чисельності пацієнтів з опіковими ураженнями, що є наслідком військового конфлікту в Україні, особливо враховуючи застосування країною-агресором зброї на основі фосфору, істотно підвищує потребу в ефективних медичних препаратах. [4]

В Україні для лікування рубцевих змін шкіри застосовуються медикаментозна терапія, лазерна терапія та хірургічне втручання. Препарати місцевої дії (креми, мазі, гелі) зазвичай демонструють низьку ефективність та потребують тривалого застосування (3–6 місяців). Лазерна терапія обмежена протипоказаннями (запалення, вагітність, онкопатології, гіперпігментація, схильність до келоїдів) і не завжди забезпечує проникнення в глибокі шари шкіри. Хірургічне лікування також має низьку обмежень, включаючи дерматози, коагулопатії та ризик інфекцій. Натомість ферментна терапія колагеназою вважається альтернативою, що мінімізує ризик рецидивів і знижує ймовірність інфекцій, зберігаючи бар'єрну функцію шкіри. [5,6]

Мета даної кваліфікаційної роботи – розробити ділянку доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу (у вигляді технологічної та апаратурної схем) ферменту колагенази бактеріями *Bacillus megaterium* КМ 369985.

Новизна даної роботи полягає в отриманні високоактивного ферменту колагенази призначеного для ін'єкційного застосування в медичній практиці, з використанням *B. megaterium* КМ 369985, який росте на економічно вигідному поживному середовищі.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА КОЛАГЕНАЗИ

Колагеназа (рис. 1.1) – фермент, який відносять до групи протеаз, враховуючи його здатність вибірково розщеплювати колаген, що має білкову природу та є ключовим фібрилярним компонентом позаклітинного середовища (позаклітинний матрикс, ECM – extracellular matrix). [3]

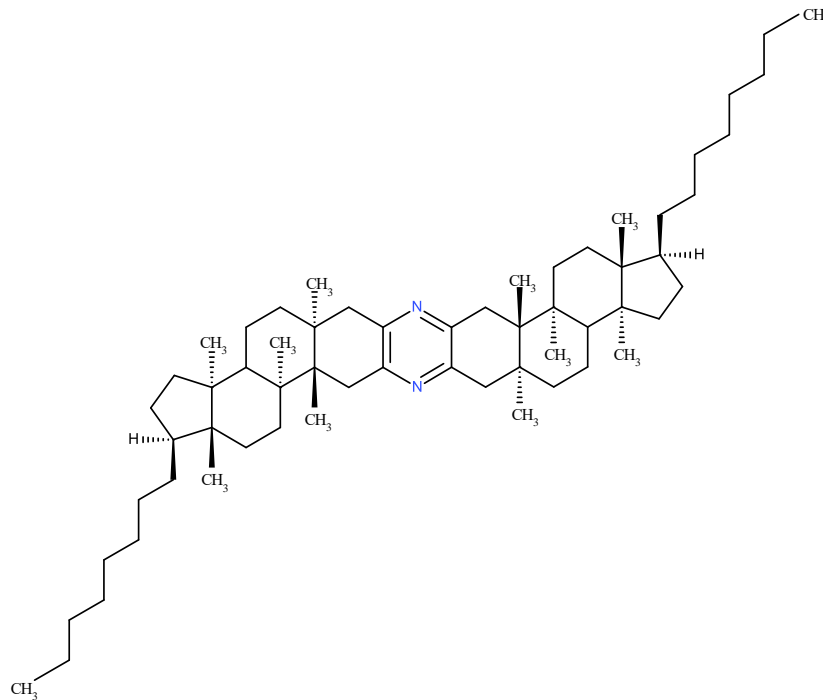


Рис. 1.1. Структурна формула ферменту колагенази [7]

Для систематизації та розуміння дії величезної кількості різноманітних ферментів, які існують у живих організмах, було запропоновано розподілити ферменти за групами. Це дозволяє впорядкувати ці реакції та ферменти, що їх каталізують, у логічну систему, що полегшує вивчення та розуміння їхньої різноманітності та функцій. Кожному ферменту надають унікальний номер, згідно номенклатури Enzyme Commission code (EC code). Зокрема, колагеназа віднесена до класу гідролаз (EC 3), підкласу пептидогідролаз (EC 3.4), групи металопротеїназ (EC 3.4.24) і має специфічний реєстраційний номер EC 3.4.24.3. [8]

					НУХТ БТЕК 04.01.31 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Пархомова О.О.				РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА КОЛАГЕНАЗИ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Красінько В.О.						12	141
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

Кількісне визначення ферментів у масових одиницях (грамах) є некоректним, враховуючи те, що маса білку нічого не говорить про його каталізуючу здатність, тому для їхньої характеристики застосовують одиниці активності. Стандартною величиною вважається міжнародна одиниця активності (МО), проте в науковій та прикладній літературі частіше використовують юніт (U), що виражається у вигляді U/мг або U/мл, залежно від способу нормування активності ферменту. [9]

1.1. Фізико-хімічні властивості колагенази

Колагеназа, будучи протеїном з одноланцюговою поліпептидною структурою, в процесі формування третинної конфігурації (що характерна для більшості ензимів) набуває глобулярної організації. Відповідно до класифікації ферментів, колагеназа не належить до регуляторних ензимів і, як наслідок, не має типових алостеричних центрів регуляції. Проте, як представник родини металопротеїназ, специфічність дії якого залежить, в першу чергу, від іонів цинку (Zn^{2+}), колагеназа характеризується унікальними структурно-функціональними особливостями. Її активний центр містить консервативний амінокислотний мотив HEXXH, що складається із залишків таких амінокислот, як : гістидину (H), глутамату (E) та двох варіабельних амінокислот (XX), завершуючись ще одним залишком гістидину (H). [10,11] Попри те, що до активного центру колагенази входить обмежена кількість амінокислотних залишків, слід зазначити, що загальний амінокислотний склад ферменту включає 17 амінокислот (за винятком триптофану, аспарагінової та глутамінової кислот). [12]

Фізико-хімічні параметри колагеназ мікробного походження значною мірою варіюють залежно від виду продуцента. [3] В *табл. 1.1* представлено найбільш поширені види мікроорганізмів-продуцентів колагенази разом із відповідними молекулярними масами ферменту.

Таблиця 1.1

Молекулярна маса ферменту колагенази

Вид мікроорганізму - продуцента	Молекулярна маса колагенази, кДа
<i>Streptomyces species</i> 1349	30-40
<i>Streptomyces species</i> 3B	97 та 116
<i>Clostridium histolyticum</i>	68-125
<i>Geobacillus collagenovorans</i> MO-1	210

Стабільність і каталітична активність колагенази – основні параметрами, що визначають її ефективність у біохімічних процесах. Ці характеристики насамперед обумовлені кислотно-лужним балансом середовища а також температурними умовами. Розглянемо, для прикладу, колагеназу, що була отримана зі штаму *Bacillus pumilus* Col-J [13,14]:

- Максимальна активність при 45°C та рН 7,5 - свідчить про адаптацію ферменту до мезофільно-термофільних умов.
- Термостабільність: 50% початкової активності ензиму виявлено навіть після 5-хвилинної експозиції при температурі 70°C або 10-хвилинного впливу 60°C – іншими словами висока резистентність до теплової денатурації.
- Зниження активності ферменту – за наявності йонів свинцю, мангану, етилендіамінтетраоцтової кислоти, та β -меркаптоетанолу, що, ймовірно, пов'язано з порушенням просторової організації активного центру ензиму, хелатуванням необхідних кофакторів чи руйнуванням дисульфідних містків між амінокислотами.
- Підвищення активності ферменту – за наявності йонів кальцію, магнію, та особливо цинку – взаємодіють з доменами ферменту, які відповідають за процес каталізу.

Дослідження, проведені щодо колагенази, отриманої зі штаму грампозитивних бактерій *Lysinibacillus sphaericus* VN3, підтверджують її чітку залежність від кислотно-лужного середовища. Дослідження впливу кислотності продемонстрували, що інкубація в діапазоні рН 6,0–8,0 знижувала активність ферменту до 60–70% від початкового рівня, що може бути наслідком змін у просторовій структурі активного центру. Аналіз отриманих даних підтверджує гіпотезу про значну варіабельність властивостей колагеназ залежно від біологічного джерела їх походження. [15]

Отже, можна підсумувати, що активність та стабільність як ферментів, так і будь-яких цільових продуктів, безпосередньо залежать від умов існування продуцента, включаючи температурний режим, рН-середовище та доступність необхідних іонних кофакторів. Відповідно, колагенази, що синтезуються мікроорганізмами, адаптованими до екстремальних умов, можуть суттєво

відрізнятися за своїми каталітичними характеристиками від тих, що функціонують у стандартному середовищі. Це підкреслює важливість індивідуального підходу до дослідження та застосування ферментів у біотехнологічних процесах.

1.2. Механізм дії ферменту колагенази

Як було зазначено раніше, колагенази здатні руйнувати волокна колагену. Загалом, колаген (рис. 1.2) – це білкова структура, яка в своєму складі містить низку ковалентно приєднаних вуглеводних груп, формуючи молекулу глікопротеїну.

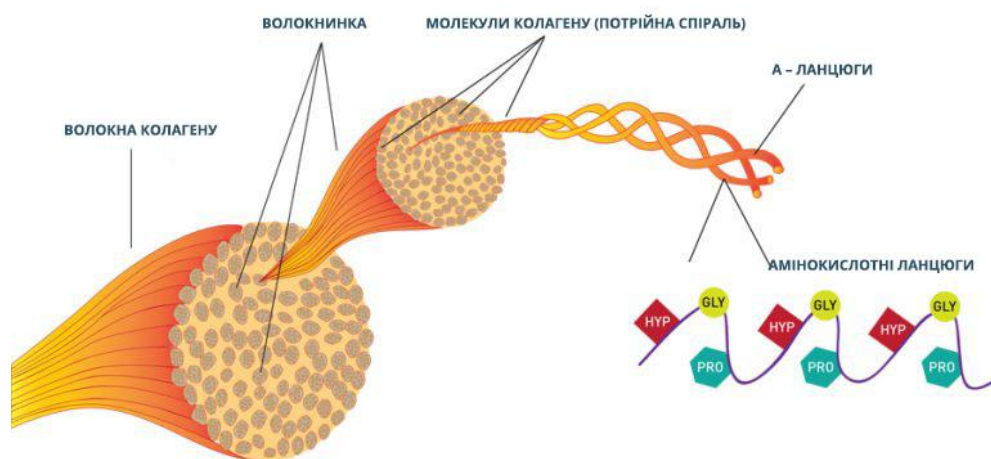


Рис. 1.2. Структура колагенового волокна [3]

Біосинтез колагену розпочинається з транскрипції відповідних генів – де продуктом процесу є мРНК (матрична РНК), яка транспортується до рибосом, розташованих на ендоплазматичному ретикулумі, де стартує етап трансляції з метою формування пептидних α -ланцюгів. Амінокислотний склад цих ланцюгів характеризується високим вмістом гліцину, проліну та лізину, а також гідроксипроліну (зустрічається рідше). Після синтезу, три α -ланцюги згортаються одна навколо одної, утворюючи потрійну спіраль проколагену. Цей комплекс транспортується до апарату Гольджі, де упакується та виділяється у позаклітинний матрикс. Залежно від типу колагену (I, II, III, IV, V тощо), проколаген перетворюється на колагенові фібрили та волокна, що забезпечують структурну підтримку тканин. [16]

Колаген, будучи головним компонентом ЕСМ, переважно локалізується у тканинах, що характеризуються високим вмістом фібрилярних типів колагену (I, II, III та V тип). Прикладом таких тканин є шкіра, кісткова тканина, сухожилля, стінки кровоносних судин та хрящова тканина. Саме ці фібрилярні форми колагену

відіграють ключову роль у забезпеченні механічної міцності та еластичних властивостей зазначених біологічних структур. [16]

Здатність мікробних колагеназ розщеплювати не лише цілісні, природні волокна колагену, але й ті, що зазнали структурних змін або деформацій через вплив зовнішніх чинників (наприклад, високих температур чи агресивних хімічних речовин) – є унікальною особливістю, що робить їх надзвичайно корисними в біотехнологічних і медичних застосуваннях, де їх використовують для очищення патологічно змінених тканин та стимуляції регенеративних процесів. [3]

Ключова функція мотиву HEXXH колагенази полягає у координаційному зв'язуванні іонів Zn^{2+} , що є абсолютно необхідною умовою для каталізу реакції гідролізу пептидних зв'язків колагенового волокна, забезпечуючи стабілізацію ферментної структури та активацію молекул води в процесі каталітичного розщеплення:

1. Іон Zn^{2+} притягує електрони з молекули води, відбувається поляризація, під час якої атом кисню стає електронегативним, а водень – електропозитивним, при цьому зв'язок O-H слабшає.
2. В результаті відбувається депротонування, а глутамат приймає протон від поляризованої молекули та перетворює його на високоактивний іон OH^- .
3. Як наслідок нуклеофіл (OH^-) атакує пептидний зв'язок в молекулі колагенового волокна ініціюючи процес гідролізу. [10,11] Загальний механізм цього процесу представлено на схемі (рис. 1.3). [17]

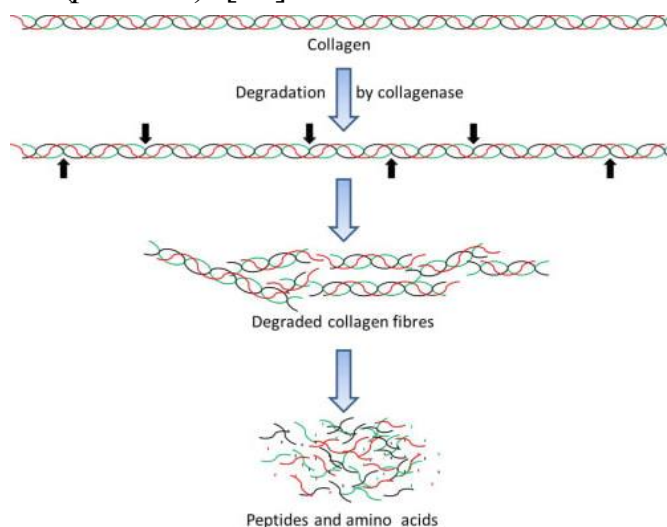


Рис. 1.3. Деградація колагену ферментом колагеназою [17]

1.3. Отримання ферменту колагенази

Перед тим, як розглядати можливі варіанти отримання цільового продукту, варто зазначити, що даний тип ферменту синтезується як клітинами мікроорганізмів, так і клітинами тварин – головна відмінність яких – різний вплив на волокна колагену. Тваринні колагенази (металопротеїнази MMP-1, MMP-8, MMP-13), характеризуються високою специфічністю до певних ділянок колагенового ланцюга, забезпечуючи контрольоване розщеплення та регуляцію ремоделювання ЕСМ. На відміну від них, мікробні колагенази демонструють ширший спектр дії, здатні розщеплювати як нативні, так і модифіковані волокна колагену, що зумовлює їхню цінність у біомедичних технологіях для очищення уражених тканин і стимуляції регенерації. [3,18]

Сучасні методи отримання колагенази базуються на використанні як сировини природного походження, так і біотехнологічних методів. Традиційно ензим екстрагують із тканин та органів тварин, проте цей підхід характеризується низьким виходом кінцевого продукту та істотними втратами вихідного матеріалу. Альтернативним і більш ефективним методом є мікробний синтез, що забезпечує високу продуктивність та можливість масштабування. Однак не всі мікроорганізми-продуценти колагенази можуть бути використані у промисловості через супутню продукцію токсичних сполук. Власне, *Clostridium histolyticum*, *Vibrio alginolyticus* та *Porphyromonas gingivalis* разом із ферментативними комплексами можуть синтезувати токсини, що обмежує їх застосування в медичних і фармацевтичних розробках. [13]

Значний інтерес становлять види мікроорганізмів, що не утворюють токсичні метаболіти. До таких продуцентів належать *Streptomyces species*, *Bacillus subtilis* а також *Bacillus licheniformis*, які синтезують ферменти зі стабільними фізико-хімічними характеристиками. Регулювання ключових параметрів культивування, таких як рН, температура, концентрація іонів металів, а також джерел вуглецю та азоту, сприяє інтенсифікації процесу біосинтезу, а застосування генетичних та метаболічних інженерних стратегій дозволяє створювати штами з підвищеним рівнем продуктивності та покращеними функціональними характеристиками синтезованого ферменту. [13]

1.4. Сфери застосування ферменту колагенази

Незважаючи на розмаїття технологічних застосувань та цілей використання ферменту, його дія завжди зводиться до єдиного механізму – гідролітичного руйнування колагенових волокон.

Колагенази мають високий потенціал у тромболітичній терапії, оскільки здатні руйнувати фібрин (високомолекулярний білок плазми крові – найвагоміша складова тромбу). Це відкриває можливості для їх комбінованого застосування з іншими препаратами що представлені на ринку - тромболітиками, для ефективного лікування тромбозів станів, що виникають внаслідок раптового зменшення або повного припинення кровотоку в коронарних артеріях. Деградуючі фібринові сітки в тромбах, колагенази дозволяють прискорити руйнування тромбоутворень, знижуючи ризик розвитку серцево-судинних захворювань. [3]

Використання колагенази розглядалось і в косметичній індустрії. При застосуванні в косметичних процедурах фермент застосовують у невисоких концентраціях, що дозволяє відновлювати структуру епідермісу без порушення цілісності здорових тканин. Цей процес ініціює реструктуризацію дермальних волокон, покращує мікроциркуляцію і підвищує еластичність шкіри, що значно зменшує виразність вікових змін. [3]

Нещодавнє дослідження [19] підтверджує ефективність ін'єкційного ферментного препарату для лікування рубців різної етіології. Введення колагенази в зону рубця сприяє перерозподілу колагенових фібрил, зменшенню щільності та товщини рубця, роблячи його менш помітним і більш еластичним. Фермент також вирівнює поверхню шкіри, покращуючи її зовнішній вигляд. Цей метод особливо ефективний для лікування глибоких або великих рубців, таких як післяопікові чи хірургічні, де мазі та креми з ферментами малодієві. Ін'єкційне введення колагенази не лише зменшує видимість рубців, а й покращує функціональність тканин, знижуючи ризик контрактур і больового синдрому, що робить його перспективним напрямком у сучасній терапії.

Лікування рубцевих утворень, спричинених зазвичай опіковими травмами другого, третього та четвертого ступеня, здійснюється за допомогою ін'єкцій

колагенази, яка вводиться безпосередньо в уражену ділянку шкіри з метою зменшення розмірів рубцевої тканини. Терапевтичний курс лікування зазвичай триває 3 - 4 тижні (в середньому 25 днів), під час якого пацієнту щоденно вводять одну ін'єкцію. Згідно даним наукових досліджень, рекомендовані дози колагенази на одну ін'єкцію варіюються в межах 150 - 500 Од. Для лікування дорослих пацієнтів та дітей найоптимальнішою є середня доза в 300 Од на одну ін'єкцію. [20]

На сьогоднішній день відомі два основні ліофілізовані препарати колагенази, що застосовуються для лікування рубцевих тканин:

1. «Collagenase 150 IU» (виробник *Simildiet*, Іспанія) – представлений у формі ліофілізату у скляних флаконах (5 флаконів в упаковці). Перед застосуванням препарат розчиняють у 5 мл фізіологічному розчині (0,9% NaCl) для ін'єкцій та вводять безпосередньо після розчинення ферменту. [21]
2. «Collagenase 1500 IU» (виробник *MCCosmetics*, Іспанія) – характеризується вищою ферментативною активністю порівняно з попереднім препаратом. Випускається у флаконах із темного скла (5 флаконів в упаковці) та перед введенням розчиняється у фізіологічному розчині аналогічним способом. [22]

Оскільки препарати колагенази вводяться підшкірно в ділянку рубцевої тканини, їх стерильність є обов'язковою умовою. В *табл. 1.2.* наведено основні фізико-хімічні характеристики ліофілізованого препарату. [23,24]

Таблиця 1.2

Фізико-хімічні характеристики ліофілізованого препарату колагенази

Характеристика	Параметр
Фізична форма	Ліофілізований порошок
Колір	Від світло коричневого до коричневого
Умови зберігання	При температурі від +2°C до +10°C у сухому середовищі для запобігання інактивації ферменту
Кофактори та активатори	Йони кальцію, магнію та цинку
Інгібітори активності	Хелатуючі агенти (EDTA, EGTA), відновники дисульфідних зв'язків (ДТТ, 2-меркаптоетанол), амінокислоти (цистеїн, гістидин)

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

З поміж численних переваг мікробіологічного синтезу ферментів, зокрема високої ефективності, економічності та екологічної доцільності, важливим аспектом є обґрунтований вибір біологічного продуцента. Незважаючи на широке різноманіття мікроорганізмів, не всі з них є придатними для біотехнологічного застосування, оскільки деякі штами здатні продукувати токсичні метаболіти, що можуть забруднювати кінцевий продукт і становити потенційну загрозу для персоналу. Тому вибір безпечного, непатогенного та високопродуктивного мікроорганізму є ключовою умовою розробки ефективної та безпечної технології отримання ферментного препарату. [3,25]

Одним із найбільш перспективних мікробних продуцентів колагенази, придатних для біотехнологічного застосування, є штам *Bacillus megaterium* КМ 369985. Цей штам було ізольовано зі зіпсованих зразків шкіри, які були отримані у різних регіонах Махараштра (Індія), шляхом мікробіологічного скринінгу з урахуванням здатності до синтезу позаклітинних ферментів. *B. megaterium* КМ 369985 демонструє високий потенціал до біосинтезу колагенази, досягаючи найвищої активності — 600 Од/мл — на 72-й годині культивування, що свідчить про його ефективність у виробничих умовах. Окрім високої продуктивності, варто відзначити високу біобезпечність та відсутність патогенних властивостей штаму, що робить його придатним для застосування в медицині, зокрема в розробці ін'єкційних форм ферментних препаратів. [26]

Аналізуючи дані, представлені в табл. 2.1, можна відзначити, що до високопродуктивних мікроорганізмів-продуцентів колагенази, крім *B. megaterium* КМ 369985, належить також вид бактерій *Bacillus cereus* що характеризується здатністю продукувати фермент колагеназу з активністю 305,39 Од/мл.

					НУХТ БТЕК 04.01.31 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		Пархомова О.О.			РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Перевір.</i>		Красінько В.О.					20	141
<i>Консультант</i>						Кафедра БТМ		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		Стабніков В.П.						

Аналіз сучасної наукової літератури та результатів останніх досліджень свідчить про наявність серед представників роду *Bacillus* різних штамів, здатних до синтезу колагенази, однак їхня ферментативна активність може істотно відрізнятись. Зокрема, згідно з даними [26,27], штам *Bacillus sp.* DPUA 1728 продукує колагеназу з активністю лише 86,27 Од/мл, що є в декілька разів нижчим порівняно з показниками високопродуктивних штамів, таких як *B. megaterium* КМ 369985 (600 Од/мл). Такі варіації в рівнях ферментної активності можуть бути зумовлені низкою факторів:

1. По-перше, генетична гетерогенність між видами та штамми бактерій безпосередньо впливає на регуляцію експресії генів, відповідальних за синтез протеолітичних ферментів. Відомо, що наявність або відсутність певних регуляторних елементів, активаторів транскрипції чи мутацій у структурних генах колагенази може істотно змінювати кількісні характеристики продукції ферменту. [26,27]

2. По-друге, значну роль відіграють умови культивування, зокрема склад поживного середовища, наявність індукторів (таких як колаген), рівень аерації, рН середовища, температура, тривалість ферментації тощо. [26,27]

Навіть мінімальні зміни в одному з параметрів можуть призводити до різкого зниження або підвищення ферментативної активності. Крім того, активність колагенази залежить і від післясинтетичних механізмів регуляції — стабільності ферменту, наявності інгібіторів у культуральному середовищі, здатності клітини ефективно секретувати фермент у позаклітинному середовищі. Аналіз отриманих результатів дає підстави стверджувати про наявність значних міжштамових відмінностей, які мають як генетичну, так і фізіолого-біохімічну природу. Це, в свою чергу, підкреслює доцільність глибшого вивчення перспективних штамів-продуцентів, зокрема з точки зору молекулярно-генетичних механізмів регуляції біосинтезу колагенази, з метою подальшого їхнього раціонального використання у фармацевтичній та біотехнологічній галузях. [26,27]

Слід також враховувати ще один важливий параметр, який має певний вплив на вибір штаму-продуцента для подальших етапів підготовки посівного матеріалу — це тривалість культивування мікроорганізму на стадії промислового ферментаційного

процесу. Як видно з *табл. 2.1*, у випадку з *B. megaterium* КМ 369985, оптимальна тривалість ферментації не перевищує 72 годин, що є технологічно прийнятним і економічно обґрунтованим показником. Водночас штам *Bacillus sp.* DPUA 1728 демонструє значно коротший цикл культивування — лише 24 години, що на перший погляд може здаватися перевагою. Проте, низький рівень ферментативної активності (86,27 Од/мл) зводить нанівещь потенційні переваги швидшого виробничого циклу. Це вказує на те, що скорочення тривалості культивування не компенсує недостатній рівень біосинтезу цільового ферменту, і, відповідно, такий штам є менш придатним для масштабного виробництва. [26,27]

У процесі визначення найпридатнішого мікроорганізму для виробництва колагенази важливим критерієм, поряд з біосинтетичною продуктивністю та тривалістю ферментації, є фінансова доцільність застосування конкретного поживного субстрату. Поживне середовище має бути не лише з усіма необхідними елементами для забезпечення активного росту клітин, а й економічно вигідним. Як свідчать результати, представлені в *табл. 2.2*, витрати на підготовку середовища для *Bacillus sp.* DPUA 1728 становлять 38,43 грн/л, однак кінцева продуктивність щодо ферменту залишається вкрай низькою (86,27 Од/мл), що ставить під сумнів рентабельність такого підходу. У свою чергу, вирощування *Bacillus cereus* обходиться у 35,88 грн/л і демонструє значно вищу вихідну активність (305,39 Од/мл), що робить цей штам більш привабливим з погляду промислової реалізації.

З урахуванням сукупності техніко-економічних показників найбільш вигідним варіантом серед досліджених продуцентів стане штам *Bacillus megaterium* КМ 369985. Вартість поживного середовища для його культивування становить 20,78 грн/л, що знаходиться у межах прийнятного цінового діапазону. При цьому мікроорганізм характеризується найвищою ферментною активністю (600 Од/мл) за тривалості біопроеесу - 72 години, що свідчить про його високу технологічну ефективність і доцільність впровадження у виробничу практику.

Порівняльна характеристика продуцентів колагенази

Біологічний агент	Склад середовища для культивування		Період культивування, год	Ферментативна активність колагенази у культуральній рідині (ОД/мл)	Умови культивування	Література
	Компонент	Концентрація, г/л				
1	2	3	4	5	6	7
<i>Bacillus megaterium</i> КМ 369985	Глюкоза Колаген CaCl ₂ NaH ₂ PO ₄ K ₂ HPO ₄	20 10 0,05 0,5 0,5	72	600	Накопичення посівного матеріалу здійснювали в качалочних колбах (180 об/хв), при температурі 37°C та рН 7,5.	[26]
<i>Bacillus cereus</i>	ПС для культивування: Пептон Дріжджовий екстракт Глюкоза Агар ПС для стимулювання продукування колагенази: Желатин NH ₄ Cl MgSO ₄ × 7H ₂ O K ₂ HPO ₄ Мінеральний розчин: FeSO ₄ × 7H ₂ O MnCl ₂ × 4H ₂ O ZnSO ₄ × H ₂ O CaCl ₂ × H ₂ O	10 3 20 15 17 1 0,6 4,35 1 1 1 1	72	305,39	Накопичення посівного матеріалу проводили в колбах Ерленмейера об'ємом 250 мл на качалках (100 об/хв), при температурі 30°C та рН 7,8.	[29]

Закінчення табл 2.1

1	2	3	4	5	6	7
<i>Bacillus sp.</i> DPUA1728	ПС для культивування: Екстракт яловичини Гідролізат казеїну Крохмаль КН ₂ РО ₄ MgSO ₄ × 7H ₂ O ZnSO ₄ × H ₂ O NaCl Колаген Агар	2 17,5 1,5 0,5 0,2 0,1 1 2,5 15	24	86,27	Накопичення посівного матеріалу проводили в колбах Ерленмейера об'ємом 125 мл, що містили 25 мл поживного середовища, на качалках (160 об/хв) при температурі 37°C та рН 9,0.	[27, 28]

Затрати на поживні середовища для культивування продуцентів та одержання ферменту колагенази

Біологічний агент	Складник поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ринкова ціна складника, грн/кг	Вартість складника (грн) на 1 л ПС	Інформаційний ресурс (1-9)*
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
<i>Bacillus megaterium</i> КМ 369985	Глюкоза	20	42	0,84	1
	Колаген	10	1980	19,8	2
	CaCl ₂	0,05	37,80	0,00189	1
	NaH ₂ PO ₄	0,5	122	0,061	3
	K ₂ HPO ₄	0,5	156	0,078	1
		Ціна за 1 л ПС -20,78 грн			
<i>Bacillus cereus</i>	Пептон	10	1120	11,2	2
	Дріжджовий екстракт	3	1800	5,4	2
	Глюкоза	20	42	0,84	1
	Агар	15	723,37	10,85055	5
	Желатин	17	380,72	6,47224	5
	NH ₄ Cl	1	46,80	0,0468	1
	MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,6	20,40	0,01224	1
	K ₂ HPO ₄	4,35	156	0,6786	1
	FeSO ₄ × 7H ₂ O	1	28,80	0,0288	1
	MnCl ₂ × 4H ₂ O	1	214	0,214	2
	ZnSO ₄ × H ₂ O	1	80	0,08	2
	CaCl ₂ × H ₂ O	1	64	0,064	4
	Ціна за 1 л ПС – 35,88 грн				

<i>Bacillus sp.</i> DPUA1728	Екстракт яловичини	2	1934,07	3,86814	5
	Гідролізат казеїну	17,5	571,08	9,9939	5
	Крохмаль	1,5	100	0,15	2
	KH ₂ PO ₄	0,5	97,96	0,04898	2
	MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,2	20,40	0,00408	1
	ZnSO ₄ × H ₂ O	0,1	80	0,008	2
	NaCl	1	17	0,017	2
	Колаген	2,5	1980	4,95	2
	Агар	15	723,37	10,85055	5
	Желатин	15	380,72	5,7108	5
	Дріжджовий екстракт	1	1800	1,8	2
	K ₂ HPO ₄	2	156	0,312	1
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1	20,40	0,0204	1
	MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,1	20,40	0,00204	1
	Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O	0,9	696	0,6264	2
	CaCl ₂	0,1	37,80	0,00378	1
	Ціна за 1 л ПС – 38,43 грн				

Примітка. * - Ціна компонентів актуальна станом на 1 березня 2024 року : 1 - <https://www.systopt.com.ua>, 2 - <https://prom.ua>, 3 - <https://snabhim.com.ua>, 4 - <https://runainter.com/ua>, 5 - <https://www.alibaba.com>. Ціни було конвертовано з долара в гривню відповідно до курсу станом на 1 березня 2024 р.

Таким чином, для обґрунтованого вибору найбільш ефективного біологічного агента доцільно провести розрахунок умовної вартості однієї одиниці активності колагенази, що дозволить зіставити економічну доцільність використання різних продуцентів з урахуванням витрат на поживне середовище та рівня ферментативної активності. (табл. 2.3).

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 од ферменту колагенази

Біологічний агент	Одиниця активності на мл культуральної рідини (од/мл)	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного ферменту, од/год	Вартість 1 л ПС, грн/л	Умовна вартість 1 од цільового продукту, грн/од
1	2	3	4	5	6
<i>Bacillus megaterium</i> КМ 369985	600	72	8,33	20,78	0,035
<i>Bacillus cereus</i>	305,39	72	4,24	35,88	0,117
<i>Bacillus sp.</i> DPUA1728	86,27	24	3,59	38,43	0,445

Результати, представлені в табл. 2.3, вказують на значну різницю в економічній ефективності досліджених штамів-продуцентів колагенази. Зокрема, штам *Bacillus sp.* DPUA1728 характеризується найменш вигідним співвідношенням «вартість/активність»: за кожен одиницю ферменту необхідно витратити 0,445 грн, що робить цей варіант фінансово невиправданим. До того ж, рівень ферментної активності цього мікроорганізму майже у сім разів нижчий порівняно з продуктивністю штаму *B. megaterium* КМ 369985. Щодо штаму *Bacillus cereus*, то хоча він демонструє вищу продуктивність (305,39 Од/мл), цей показник удвічі поступається активності, досягнутій *B. megaterium* КМ 369985. Крім того, собівартість отримання однієї одиниці активності у *B. cereus* у трикратному розмірі перевищує витрати на аналогічний показник у *B. megaterium* (0,117 грн/од проти 0,035 грн/од).

Зіставлення біосинтетичних характеристик та економічних параметрів дозволяє зробити висновок, що *B. megaterium* КМ 369985 є найбільш доцільним вибором для масштабного виробництва колагенази. Високий рівень ферментної активності (600 Од/мл), помірна тривалість культивування та найнижча умовна вартість одиниці продукції забезпечують оптимальний баланс між технологічною результативністю й економічною вигодою, що визначає доцільність впровадження саме цього штаму у виробничу схему.

2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента *Bacillus megaterium* КМ 369985

Морфолого-культуральні ознаки біологічного агента. B. megaterium КМ 369985 (рис 2.1, а) – характеризується широкою екологічною поширеністю. Вони зустрічаються в морській воді, на рисових полях, однак переважно класифікуються як ґрунтові мікроорганізми завдяки своїй здатності ефективно колонізувати та функціонувати в умовах ґрунтового середовища, зокрема в ділянках, прилеглих до підприємств, що спеціалізуються на обробці та виробництві шкіряних виробів.[30, 31]

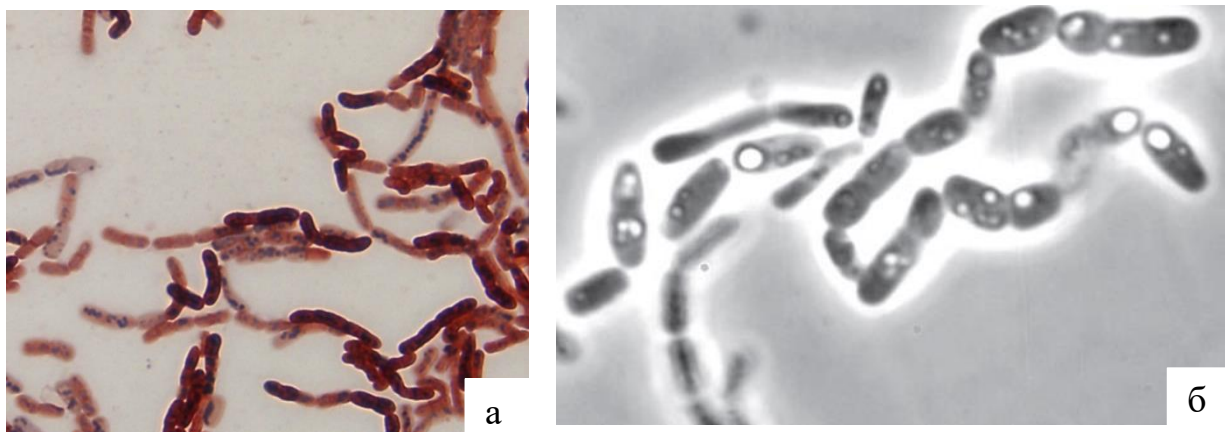


Рис. 2.1. *B. megaterium* КМ 369985 : а – зовнішній вигляд; б – розташування спор [30, 32]

Клітини *B. megaterium* КМ 369985 мають паличкоподібну форму з характерно заокругленими кінцями та, зазвичай, розміщуються поодинокі, хоча можуть зустрічатися парами або утворювати короткі ланцюжки. Вони є рухливими завдяки наявності джгутиків. Представники цього виду здатні до спороутворення —

формують ендоспори, що характеризуються високою стійкістю до несприятливих чинників довкілля, включаючи високу температуру, УФ-випромінювання, дію хімічних речовин та зневоднення. Спори можуть розташовуватись у клітині по-різному: центрально, субтермінально або термінально, що є важливою видовою діагностичною ознакою (рис 2.1, б). [32]

B. megaterium КМ 369985 вирізняється порівняно великими розмірами клітин: довжина може сягати 4 мкм, а діаметр становить приблизно 1,5 мкм. Об'єм клітини цього мікроорганізму майже у 100 разів перевищує об'єм грамнегативної бактерії *Escherichia coli*. Завдяки таким морфологічним особливостям *B. megaterium* КМ 369985 є зручним модельним об'єктом для вивчення процесів біосинтезу структурних компонентів, зокрема клітинної стінки, цитоплазматичної мембрани, спор та інших внутрішньоклітинних елементів. [33]

Ідентифікацію бактерій штаму та вивчення культуральних особливостей *B. megaterium* КМ 369985 (рис 2.2) зазвичай здійснюють з використанням поживних середовищ, таких як агар Мюллера–Хінтона та кров'яний агар, збагачений овечою кров'ю (SBA). Нижче наведено основні культуральні ознаки притаманні данному штаму:

- Кров'яний агар (з овечою кров'ю, SBA): На цьому середовищі колонії *B. megaterium* КМ 369985 мають світло-біле забарвлення з можливим сіруватим відтінком. Їх форма зазвичай округла, поверхня гладка й блискуча, краї — чіткі та рівні. Переважно формуються невеликі колонії, хоча окремі колонії можуть досягати середніх розмірів. [34]
- Агар Мюллера–Хінтона: Характерною ознакою росту є утворення жовтувато-сірих колоній округлої форми. Вони мають плоский вигляд, рівні контури, блискучу поверхню та здебільшого середній розмір. [35]

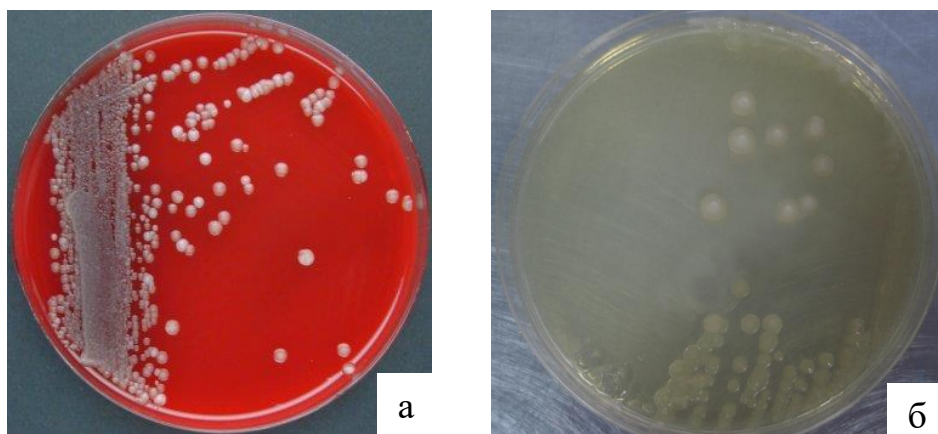


Рис.2.2. Культура *B. megaterium* КМ 369985 на: а - агарі з овечою кров'ю (SBA); б - агарі Мюллера-Хінтона [34,35]

Фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента. *B. megaterium* КМ 369985 є типовим грампозитивним, аеробним, хемоорганогетеротрофним мікроорганізмом. Його оптимальна температура росту становить приблизно 30 °С, при цьому мінімальне значення температури, за якого ще можливий розвиток, варіюється в межах 3–15 °С, а максимальна температура росту сягає 45 °С. Оптимальний показник рН середовища для росту дорівнює 7,0, що дозволяє класифікувати цей мікроорганізм як нейтрофільний. Розмноження клітин відбувається шляхом простого поділу [32].

За джерела вуглецю *B. megaterium* КМ 369985 може використовувати широкий спектр органічних сполук, зокрема ефективно засвоює глюкозу, сахарозу та арабінозу. У якості джерел азоту зазвичай використовують кукурудзяний екстракт або кукурудзяне борошно. Для стимуляції біосинтезу специфічних, малопродукованих метаболітів до складу поживного середовища можуть входити додаткові компоненти, зокрема індуктори синтезу — наприклад, колаген, який запускає процес синтезу колагенази. Більшість штамів здатні рости за наявності до 7 % NaCl у поживному середовищі, однак концентрація солі 10 % є граничною — за таких умов ріст не спостерігається. [31,32]

Особливістю *B. megaterium* КМ 369985 є здатність до синтезу полі- γ -глутамінової кислоти та утворення капсули, що складається з полісахаридів різної хімічної природи. Завдяки цим властивостям мікроорганізм становить інтерес у біотехнологічному секторі. Зокрема, він застосовується для промислового виробництва ферментів — α - та β -амілаз, які беруть участь у гідролізі крохмалю та

широко використовуються в хлібопекарській галузі. Крім того, штам продукує пеніцилінамідазу — фермент, що є важливим у синтезі нових β -лактамних антибіотиків. [32,33]

Генетичний апарат бактерії представлений не лише хромосомною ДНК, а й численними плазмідами — за результатами досліджень, одна клітина може містити до семи плазмід (у середньому — чотири). Встановлено, що деякі з цих плазмід несуть гени, відповідальні за спороутворення, а також фрагменти, що кодують рибосомні РНК. Завдяки цій особливості *B. megaterium* КМ 369985 активно використовується як модельний об'єкт для вивчення процесів реплікації ДНК, функціонування генів, а також вивчення сумісності та експресії плазмідних генетичних елементів. [30]

Усе це робить *B. megaterium* КМ 369985 перспективним мікроорганізмом для застосування у біотехнології, зокрема через здатність до росту на доступних за вартістю субстратах, відсутність токсичних метаболітів та широкий спектр корисних метаболітів, що використовуються для розвитку різних галузей діяльності. [33]

2.3. Таксономічний статус біологічного агента *Bacillus megaterium* КМ 369985

B. megaterium КМ 369985, (за 2-м виданням «Керівництва Бергі з систематики бактерій»), відноситься до 18-ї групи, що об'єднує грампозитивні паличкоподібні та кокоподібні бактерії, які утворюють ендоспори. Отже, філогенетична класифікація бактерій має вигляд [32,34]:

Домен	<i>Bacteria</i>
Тип	<i>Firmicutes (Bacillota)</i>
Клас	<i>Bacilli</i>
Порядок	<i>Bacillales</i>
Родина	<i>Bacillaceae</i>
Рід	<i>Bacillus (Priestia)</i>
Вид	<i>Bacillus megaterium</i>
Штам	<i>Bacillus megaterium</i> КМ 369985

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО - ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у ферменті колагенази

Одним із найпоширеніших типів травматичних ушкоджень у побутових умовах є опіки — деструкція тканин шкірного покриву, спричинена впливом термічних агентів, агресивних хімічних речовин або електричного струму.

Сучасні підходи домедичної допомоги при термічних ураженнях охоплюють низку ефективних лікувальних стратегій, які варіюються залежно від глибини й площі пошкодження. Зокрема, до таких методів належать локальне охолодження ділянки ураження з метою зменшення термічного впливу, застосування антисептичних засобів для профілактики інфекційних ускладнень, використання місцевих протизапальних фармацевтичних засобів, а за показаннями — проведення оперативного втручання з метою видалення некротичних тканин та реконструкції шкіри. [4,19]

Проте, незважаючи на прогрес у лікувальних технологіях, одним із найчастіших наслідків опікової хвороби залишаються післяопікові рубцеві деформації. Ці структурні зміни шкіри не лише порушують її морфологічну цілісність, але й нерідко призводять до значного погіршення естетичного вигляду ураженої ділянки шкіри. [4,19] Фермент колагеназа, що входить до складу низки фармацевтичних засобів у лікарській формі кремів і мазей, широко використовується в медичній практиці для ферментативного видалення некротичних або патологічно змінених тканин ЕСМ, що сприяє ефективному очищенню уражених ділянок.

Окрім традиційного місцевого застосування, у 2023 році була опублікована наукова праця, у якій розглядалася перспектива використання колагенази у вигляді ін'єкційного препарату для терапії гіпертрофічних рубців різного походження, зокрема посттравматичних і післяопікових. Значущість ферментативної терапії із залученням колагенази полягає не лише в покращенні косметичного стану шкіри, але й у зменшенні функціонального дискомфорту, який особливо виражений у ділянках,

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.31 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Пархомова О.О.</i>			РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Красінько В.О.</i>					32	141
<i>Консультант</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

де рубцева тканина перешкоджає фізичній активності — наприклад, у зонах розташування суглобів, де рухливість є головною функцією. [19,36]

Даний фермент характеризується високою специфічністю до денатурованих форм колагену — основного структурного компонента рубцевої тканини. Завдяки вираженій протеолітичній активності, колагеназа забезпечує деградацію патологічно зміненого колагену та водночас ініціює процеси неколагенезу, тобто стимулює синтез нового, функціонально-повноцінного колагену. Окрім цього, застосування колагенази після отримання термічних уражень сприяє зниженню рівня клітинного апоптозу та некрозу, що має важливе значення для збереження життєздатності тканин. Чисельні клінічні випробування підтверджують високий рівень безпеки препарату навіть при використанні у підвищених дозуваннях, що дозволяє розглядати колагеназу як ефективний і безпечний засіб у терапії післяопікових рубців. [20,37]

Статистика 2019 року, що розміщена у відкритому доступі, показала що було зареєстровано 54 115 випадків опікових травм (дорослі), тоді як у педіатрії ця цифра становила 10 165 випадків. Водночас, у зв'язку із дестабілізацією безпекової ситуації в країні та тривалими збройними конфліктами, спостерігається стрімке зростання кількості термічних ушкоджень серед населення. Це обумовлено тим, що країна-агресор використовує зброю на основі фосфору як проти військових, так і проти цивільних осіб в Україні. Білий фосфор – основний компонент таких боєприпасів, має високу ліпофільність, швидко проникає через шкірні бар'єри та спричиняє тяжкі хімічні опіки. Припускаючи, що під час воєнного стану кількість опікових ушкоджень серед дорослого цивільного населення зростає на 25%, можна зробити висновок про суттєве погіршення ситуації. Водночас, через масову евакуацію дітей за межі України або в безпечні регіони, де не відбуваються активні бойові дії, рівень опікових травм серед дитячого населення залишається на попередньому статистичному рівні. [38]

Отже, станом на 2023 рік кількість людей що отримали опіки складає:

$$54115 + (54115 * 25\% / 100\%) = 67644$$

Терапія рубцевих змін шкірного покриву, що найчастіше виникають унаслідок опікових ушкоджень II–IV ступеня, передбачає локальне ін'єкційне введення ферменту колагенази безпосередньо у зону фіброзної тканини. Основною метою

такого лікування є зменшення об'єму рубця та пом'якшення його структури. Тривалість курсу зазвичай становить від трьох до чотирьох тижнів і в середньому охоплює 25 днів щоденного введення препарату. На основі результатів наукових досліджень визначено рекомендований діапазон дозування: від 150 до 500 одиниць дії (Од) колагенази на одну ін'єкцію. Проте, як для дорослих пацієнтів, так і для дітей, найефективнішою та найчастіше використовуваною дозою вважається 300 Од на одну ін'єкцію. [19,20]

Процес приготування ін'єкційної форми передбачає розчинення точно визначеної кількості колагенази у стерильному ізотонічному розчині натрію хлориду (0,9% NaCl) до досягнення остаточної концентрації 300 Од/мл. Для зручності, всі необхідні дані наведені у *табл. 3.1*. [19,20]

Отже, можемо поррахувати потребу у колагеназі на річний курс лікування для всіх дорослих :

$$300 \text{ Од} * 25 * 67644 = 5,1 * 10^8 \text{ Од}$$

та, для всіх дітей :

$$300 \text{ Од} * 25 * 10165 = 7,6 * 10^7 \text{ Од}$$

Таблиця 3.1

Дані для проведення розрахунку потреби у ферменті колагенази для ін'єкційного лікування рубців за рік

Вікова категорія	Доза препарату на 1 ін'єкцію, Од	Курс лікування, кількість днів	Орієнтовна кількість хворих в Україні станом на 2023 рік	Кількість одиниць ферменту на річний курс лікування, Од
Дорослі	300	25	67644	$5,1 * 10^8$
Діти	300	25	10 165	$7,6 * 10^7$
Всього				$5,9 * 10^8$

3.2. Розрахунок потужності виробництва ферменту колагенази

Ферментна терапія займає провідну роль у сучасних підходах до лікування рубцевих змін шкіри, особливо тих, що виникають внаслідок опікових уражень. Найбільш поширеною лікарською формою для застосування колагенази є мазі,

оскільки саме така форма забезпечує пролонговану дію ферменту, дозволяє йому поступово проникати в уражену тканину, та власне, має додатковий антибактеріальний ефект — за умови включення відповідних протимікробних компонентів. Окрім того, мазева основа сприяє підтримці належного рівня зволоження шкіри, що важливо для процесу регенерації. Серед зареєстрованих фармацевтичних препаратів на основі колагенази, особливої уваги заслуговує засіб «Santyl», розроблений американською компанією «Smith & Nephew», яка відома своїми розробками у сфері медичних та дерматологічних засобів. Цей препарат широко впроваджений у клінічну практику як засіб для лікування опікових пошкоджень і різних форм рубцевих утворень. [36]

Хоча мазеві форми колагенази широко застосовуються у клінічній практиці, більш виражений терапевтичний ефект у лікуванні рубцевих утворень демонструють ін'єкційні форми ферменту. Це пояснюється тим, що при внутрішньошкірному введенні колагеназа безпосередньо надходить до фіброзної тканини, створюючи високу концентрацію активної речовини в зоні патологічного процесу. Відповідно цілеспрямоване застосування надає можливість ефективніше впливати на щільні або давні рубці, сприяючи їх пом'якшенню та зменшенню. Для ін'єкційного введення використовують фермент у формі ліофілізованого порошку. На міжнародному ринку значного поширення набули ін'єкційні препарати на основі колагенази, зокрема «Collagenase 150 IU» від іспанської фірми «Simildiet» і «Collagenase 1500 IU», який виробляє компанія «Mccosmetics» (Іспанія). Однак варто зазначити, що в Україні жоден із цих препаратів на сьогодні не зареєстрований як лікарський засіб, що обмежує доступ вітчизняних медичних установ до ефективної ферментної терапії рубців. [21,22]

Відсутність зареєстрованих в Україні ліофілізованих ін'єкційних форм колагенази створює значну проблему у системі лікування патологічних змін шкіри. Хоча вітчизняна компанія «Enzim Biotech» виготовляє суху форму ферменту шляхом ліофілізації, інформація про ступінь його очищення відсутня, що не дозволяє з впевненістю стверджувати про придатність цього продукту для медичного використання у терапії рубців. Крім того, ця ж компанія виробляє мазь на основі

колагенази під торговою назвою «Іруксан», однак вона не має офіційного статусу лікарського засобу. У зв'язку з цим створення та налагодження виробництва є важливою передумовою для задоволення потреб національного фармацевтичного ринку з допомогою ефективної терапії рубцевих змін шкіри. [39,40]

Відомо, що штам *B. megaterium* КМ 369985 продукує фермент колагеназу з активністю 600 Од/мл (600 000 Од/л) [26]. Отже, дізнаємось скільки літрів культуральної рідини необхідно для отримання $5,9 * 10^8$ Од колагенази:

$$V_{кр} = 5,9 * 10^8 / 600\ 000 = 983 \text{ л}$$

При виділенні ферменту колагенази для використання в ін'єкційному препараті відсоток втрат складає від 50% до 70%. Приймаємо відсоток втрат 70%, отже загальний об'єм культуральної рідини, який необхідно отримати складає:

$$V_{кр.1} = 983 * 1,7 = 1671 \text{ л або } 1,671 \text{ м}^3$$

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів для біосинтезу колагенази

Перш за все визначимо добовий вихід культуральної рідини (V_d), спираючись на інформацію про те, що виробництво $1,671 \text{ м}^3$ займає 90 робочих днів ($T_{тр}$):

$$V_d = V_{кр} / T_{тр} = 1,671 / 90 = 0,019 \text{ м}^3/\text{добу} \approx 0,02 \text{ м}^3/\text{добу}$$

Щоб визначити об'єм продукції, отриманої за один цикл ферментації ($V_{цк}$), необхідно встановити загальну тривалість повного технологічного циклу роботи ферментера. До складу цього циклу входить час безпосереднього біосинтезу, який становить 72 години (T_k), а також проміжок часу, що витрачається на підготовчі операції перед запуском нового процесу — загалом 8,5 години ($T_{пр}$). Підготовчий етап включає низку послідовних процедур (для обладнання): візуальний огляд і промивання (1,5 год), перевірка на відсутність витоків у системі - герметизація (1 год), нагрівання (0,5 год), процес стерилізації (1 год), подальше охолодження (1 год), внесення ПС (2 год), внесення інокуляту (0,5 год) та завершальна стадія — злив готової культуральної рідини (1 год). Таким чином, загальна тривалість одного виробничого циклу дорівнює:

$$T_{цф} = T_k + T_{пр} = 72 + 8,5 = 80,5 \text{ год}$$

Об'єм КР, що отримуємо за цикл, ($V_{крц}$) становить:

$$V_{крц} = (K_1 * V_d * T_{цф})/24 = (1,2 * 0,02 * 80,5)/24 = 0,0805 \text{ м}^3/\text{цикл}$$

де, K_1 – коефіцієнт, що бере до уваги потенційний ризик контамінації ($K_1 = 1,1 \dots 1,5$).

Оскільки відомо значення об'єму КР, який отримуємо за цикл ($V_{крц}$) та коефіцієнт заповнення біореактора з аерацією ($K_3 = 0,6$), можемо розрахувати номінальний об'єм ферментера, (V_{Γ}):

$$V_{\Gamma} = V_{крц} / K_3 = 0,0805/0,6 = 0,134 \text{ м}^3$$

Отже, можемо обрати стандартний ферментер об'ємом $V_{\phi} = 0,15 \text{ м}^3$. Уточнюємо коефіцієнт заповнення ферментера, (K_3), використовуючи наступний розрахунок:

$K_3 = V_{крц} / V_{\phi} = 0,0805/0,15 = 0,54$ - не перевищує заданого значення $K_3 = 5,5 - 6,5$ для аеробного процесу.

Загальна кількість циклів розраховується наступним чином:

$$N_{цк} = 24 * T_{рд} / T_{цф} = 24 * 90 / 80,5 = 27 \text{ циклів}$$

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу колагенази бактеріями *B. megaterium* КМ 369985

Існує ризик КР під час біосинтезу через краплевинос у вентиляційній системі. В більшості випадків ці втрати (E_{ϕ}) не перевищують 10-15% (прийmemo 10 %), тому їх також потрібно врахувати для визначення точного об'єму КР що отримуємо з одного циклу ферментації :

$$V_{роб.1} = V_{крц}/(1 - E_{\phi}) = 0,0805 / (1 - 0,1) = 0,0894 \text{ м}^3 \approx 0,09 \text{ м}^3$$

Отже, ферментер ($V_{роб.1}$ – робочий об'єм) заповнений на $0,09 \text{ м}^3$. Розрахуємо номінальний об'єм ферментера ($V_{\phi.1}$), враховуючи що коефіцієнт заповнення (K_3) для процесу біосинтезу з активною подачею повітря не повинен перевищувати 0,6 :

$$V_{\phi.1} = V_{роб.1} / K_3 = 0,09/0,6 = 0,15 \text{ м}^3$$

За об'ємними характеристиками найбільш відповідним є біореактор $V_{сф.1} = 0,15 \text{ м}^3$ з коефіцієнтом заповнення ($K_{3.1}$):

$K_{3.1} = V_{роб.1} / V_{сф.1} = 0,09/0,15 = 0,6$ - не перевищує заданого значення $K_3 = 5,5 - 6,5$ для процесу з подачею повітря.

Відомо, що кількість інокуляту (X_{ϕ}), без якого неможливий процес культивування, складає 10% (від ПС), тому рекомендовані дози посівного матеріалу, які треба завчасно підготувати для отримання $0,09 \text{ м}^3$ КР складуть:

$$V_{\text{пм.1}} = V_{\text{роб.1}} * X_{\text{ф}} = 0,09 * 0,1 = 0,009 \text{ м}^3 \text{ або } 9 \text{ л}$$

Відповідно об'єм поживного середовища для даного процесу складатиме:

$$V_{\text{пс.1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пм.1}} = 0,09 - 0,009 = 0,081 \text{ м}^3$$

Знову таки, не забуваємо врахувати що під час приготування 0,009 м³ посівного матеріалу в інокуляторі спостерігається видалення КР з газовою фазою (Еф - 10%) тому враховуючи дані втрати другий робочий об'єм складає:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм.1}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 0,009 / (1 - 0,1) = 0,01 \text{ м}^3 \text{ або } 10 \text{ л}$$

Обчислимо об'єм посівного апарату, який потрібний для приготування 0,01 м³ інокуляту, беручи до уваги, що коефіцієнт заповнення (Кз) складає 0,6:

$$V_{\text{па.2}} = V_{\text{роб.2}} / K_{\text{з}} = 0,01 / 0,6 = 0,016 \text{ м}^3$$

За об'ємними характеристиками найбільш відповідним є інокулятор $V_{\text{сф.2}} = 0,015 \text{ м}^3$ з коефіцієнтом заповнення (Кз.2):

$K_{\text{з.2}} = V_{\text{роб.2}} / V_{\text{сф.2}} = 0,01 / 0,015 = 0,6$ - не перевищує заданого значення $K_{\text{з}} = 5,5 - 6,5$ для процесу з подачею повітря.

Оскільки необхідно отримати 0,01 м³ культуральної рідини обчислимо необхідну дозу посівного матеріалу, яка для цього потрібна, беручи до уваги вище наведену інформацію про вихідну кількість інокуляту:

$$V_{\text{пм.2}} = V_{\text{роб.2}} * X_{\text{ф}} = 0,01 * 0,1 = 0,001 \text{ м}^3 \text{ або } 1 \text{ л}$$

Відповідно об'єм поживного середовища складатиме:

$$V_{\text{пс.2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пм.2}} = 0,01 - 0,001 = 0,009 \text{ м}^3 \text{ або } 9 \text{ л}$$

Для отримання 1000 мл посівного матеріалу доцільніше використати колби об'ємом 750 мл, які є стандартними та розміщуються на обертових струшувачах під час вирощування. Нагадаємо, що коефіцієнт заповнення - Кз не перевищує значення 0,2, оскільки процес культивування аеробний, тому треба максимально збільшити площу поверхні двох фаз. Розрахуємо, яка кількість колб необхідна для отримання 1000 мл посівного матеріалу:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм.2}} / (V_{\text{колб}} * K_{\text{з}}) = 1000 / (750 * 0,2) = 6,6 \approx 7 \text{ колб.}$$

Для промислового отримання ферменту колагенази з використанням штаму *B. megaterium* КМ 369985 необхідно наступне обладнання: ферментер об'ємом 0,15 м³,

інокулятор на 0,015 м³ та 7 колб для обертових струшувачів. Результати проведених розрахунків для зручності представлені у *табл. 3.2*.

Таблиця 3.2

Розраховані об'єми поживних середовищ та обладнання для процесу підготовки посівного матеріалу та промислового культивування

№ стадії	Об'єм культуральної рідини V _{кр} , м ³ (л)	Уточнений об'єм культуральної рідини V _{роб} , м ³ (л)*	Об'єм інокулятору V _{ім} , м ³ (л)	Об'єм поживного середовища V _{пс} , м ³ (л)	Коефіцієнт заповнення K _з , частка	Геометричний об'єм ферментера V _{сф} , м ³ (л)
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>
III	0,0805**	0,09	0,009 (9)	0,081	0,6	0,15
II	0,009 (9)	0,01 (10)	0,001 (1)	0,009 (9)	0,6	0,015
I	0,001 (1)	0,001 (1)	-	0,001 (1)	0,2	7 колб

Примітка:

* Беручи до уваги 10% втрат рідини, що виділяється з газовою фазою. ** Об'єм КР, який отримуємо за один цикл культивування.

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ФЕРМЕНТУ КОЛАГЕНАЗИ

4.1. Шляхи катаболізму глюкози у біологічного агента *Bacillus megaterium* КМ 369985

У процесі культивування *B. megaterium* КМ 369985 поживне середовище містить глюкозу в концентрації 20 г/л, яка виконує функцію головного джерела енергії та вуглецю. Саме вона є основною сполукою, з якої клітина будує свої структури та синтезує біологічно активні речовини, зокрема фермент колагеназу. Окрім глюкози, середовище також збагачене джерелом азоту — колагеном, а також мінеральними солями, такими як CaCl_2 , NaH_2PO_4 та K_2HPO_4 , що забезпечують стабільні умови для росту і метаболізму бактерій. [26]

Хоча штам *B. megaterium* КМ 369985 ще не представлений у базі Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), вищначити шлях дисиміляції глюкози можемо ґрунтуючись на інформації про бактеріальний штам *Bacillus megaterium* NBRC 15308, інформація про який доступна в KEGG. Саме на ньому ґрунтуватиметься подальший розгляд шляхів дисиміляції глюкози. [41]

Згідно з інформацією, представленою у базі даних KEGG, процес катаболізму глюкози в клітинах *B. megaterium* NBRC 15308 здійснюється через добре вивчений і класичний біохімічний шлях — гліколіз, який також відомий під назвою шлях Ембдена–Мейєргофа–Парнаса. Цей шлях є одним із центральних механізмів енергетичного метаболізму в живих клітинах і служить основою для перетворення глюкози на простіші сполуки з подальшим вивільненням енергії, необхідної для життєдіяльності мікроорганізму.

На молекулярному рівні гліколіз представляє собою ряд ферментативних реакцій, у яких кожен етап строго контролюється специфічними ферментами. Важливу роль у цьому процесі відіграють фосфофруктокінази — зокрема ферменти 1-фосфофруктокіназа та 6-фосфофруктокіназа. Остання відіграє ключову

					НУХТ БТЕК 04.01.31 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Пархомова О.О.			РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ФЕРМЕНТУ КОЛАГЕНАЗИ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Красінько В.О.					40	141
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

регуляторну функцію у гліколітичному потоці і позначена на KEGG-схемі під класифікаційним номером КФ 2.7.1.11. (додаток 1)

Гліколітичний шлях розпочинається з активації молекули глюкози, яка, потрапивши у клітину, піддається фосфорилюванню з утворенням глюкозо-6-фосфату. Цей процес каталізується ферментом глюкокіназою, що належить до класу трансфераз і має номер КФ 2.7.1.2. Надалі глюкозо-6-фосфат може перетворюватися на глюкозо-1-фосфат у результаті реакції, яку забезпечує інший фермент — фосфоглюкомутаза (КФ 5.4.2.2).

Глюкозо-6-фосфат також може ізомеризуватися до фруктозо-6-фосфату під дією глюкозо-6-фосфатізомерази (КФ 5.3.1.9). Наступна реакція передбачає приєднання додаткової фосфатної групи за рахунок гідролізу молекули АТФ, а каталізує її фермент фруктозо-1,6-бісфосфатаза III (КФ 3.1.3.11) з утворенням фруктозо-1,6-бісфосфату, який розщеплюється на дві тривуглецеві молекули: гліцеральдегід-3-фосфат і діоксиацетонфосфат. Ця реакція каталізується ферментом фруктозо-бісфосфатальдолазою II класу, який у базі KEGG має класифікаційний номер КФ 4.1.2.13. Важливо відзначити, що між цими двома сполуками існує зворотна ізомеризація, яка відбувається за участю ферменту тріозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1), що дозволяє клітині підтримувати оптимальний баланс між формами залежно від метаболічного попиту.

Далі гліцеральдегід-3-фосфат вступає в реакцію окисного фосфорилювання, в ході якої він перетворюється на 1,3-бісфосфогліцерат. Ця реакція каталізується двома формами ферменту гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази — з КФ 1.2.1.12 та КФ 1.2.1.59. Вона має принципове значення для генерації енергії, оскільки тут відбувається перше пряме утворення високоенергетичних фосфатних сполук.

Наступна частина гліколітичного процесу передбачає поступове перетворення 1,3-бісфосфогліцерату на 2-фосфогліцерат. Спершу утворюється 3-фосфогліцерат, і цей перехід забезпечується ферментом фосфогліцераткіназою (КФ 2.7.2.3), яка одночасно каталізує утворення молекули АТФ. Потім, для переміщення фосфатної групи з положення 3 у положення 2, залучаються два типи ферментів

фосфогліцератмутази — 2,3-бісфосфогліцератзалежна (КФ 5.4.2.11) та 2,3-бісфосфогліцератнезалежна (КФ 5.4.2.12).

Завершальні стадії гліколізу включають перетворення 2-фосфогліцерату на фосфоенолпіруват за участю енолази (КФ 4.2.1.11), після чого під дією ферменту піруваткінази (КФ 2.7.1.40) спостерігається накопичення пірувату — ключовий метаболіт, що далі залучається до циклу трикарбонових кислот (ЦТК). У цьому циклі синтезуються проміжні сполуки, які не лише забезпечують клітину енергією, а й слугують попередниками для біосинтезу амінокислот, з яких формується білкова молекула колагенази. Схему дисиміляції глюкози у бактерій *B. megaterium* NBRC 15308, шляхом гліколізу, представлено нижче (рис. 4.1).

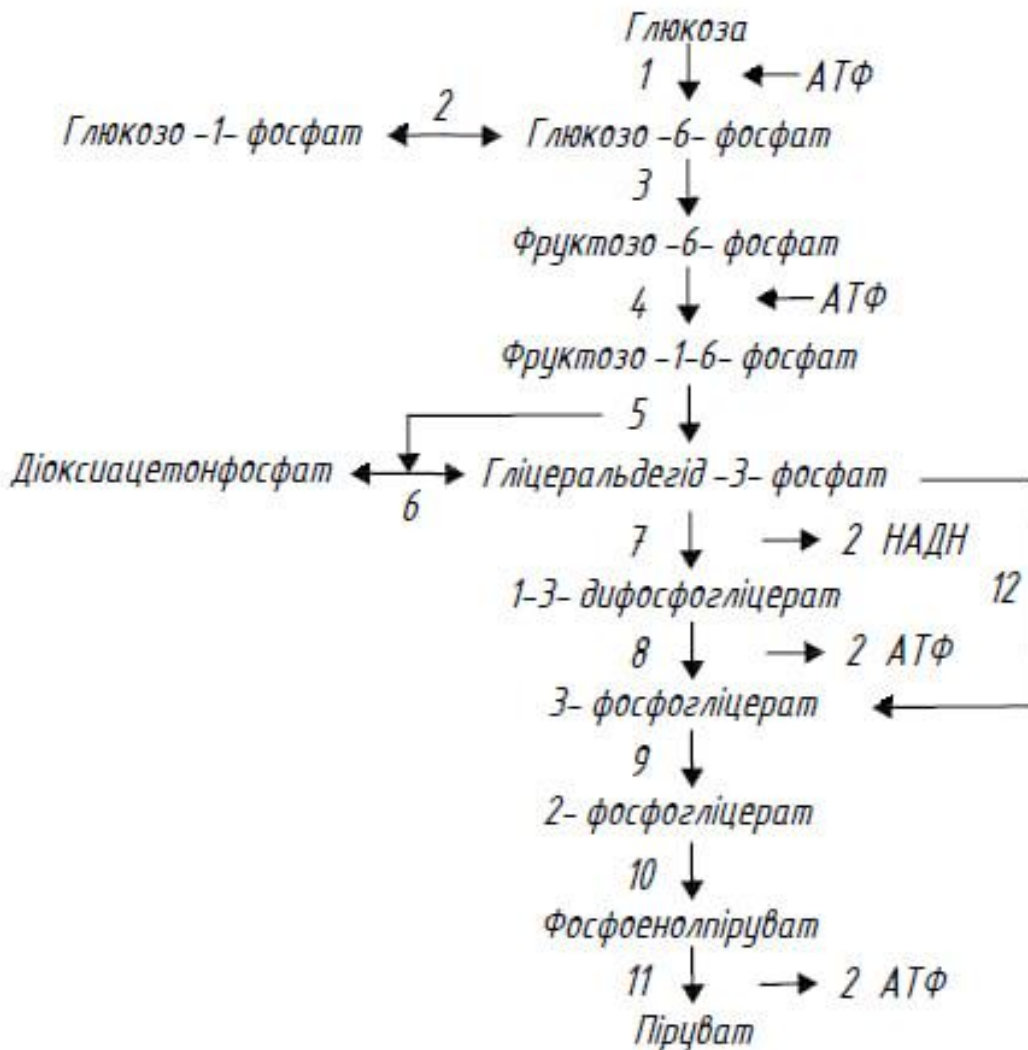


Рис.4.1. Схema дисиміляційного розпаду глюкози у *B. megaterium* NBRC 15308 згідно з KEGG

Ферменти : 1 - глюкокіназа (КФ 2.7.1.2); 2 - фосфоглюкомутаза (КФ 5.4.2.2); 3 - глюкозо-6-фосфат-ізомераза (КФ 5.3.1.9); 4 - фруктозо-1,6-бісфосфатаза III (КФ 3.1.3.11) та 6-фосфофруктокіназа 1 (КФ 2.7.1.11); 5 - фруктозо-бісфосфатальдолаза, клас II (КФ 4.1.2.13); 6 - тріозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); 7 - гліцеральдегід 3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12) та гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.59); 8 - фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 9 - 2,3-бісфосфогліцератзалежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11) та 2,3-бісфосфогліцератнезалежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12); 10 - енолаза (КФ 4.2.1.11); 11 - піруваткіназа (КФ 2.7.1.40); 12 - гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.9).

4.2. Біотрансформація глюкози у фермент колагеназу

Враховуючи відсутність інформації щодо штаму бактерій *B. megaterium* KM 369985 в базі даних KEGG на поточний момент, опис процесу біосинтезу ферменту колагенази буде здійснено на основі штаму *B. megaterium* NBRC 15308. Як було описано вище, глюкоза катаболізується до проміжної сполуки – пірувату, який одночасно виступає вихідною речовиною для утворення ацетил-КоА - каталізується ферментним піруватдегідрогеназним комплексом (КФ 1.2.4.1).

Синтезований ацетил-КоА є вихідним компонентом циклу трикарбонових кислот (ЦТК), та забезпечує клітину відновлювальними еквівалентами, необхідними для продукування енергії, а також проміжними метаболітами, що є вкрай необхідними для біосинтезу різноманітних клітинних компонентів.

Процеси гліколізу та ЦТК генерують ключові метаболіти, які слугують вихідними субстратами для синтезу цільового продукту, включаючи глюкозо-6-фосфат, 3-фосфогліцерат, піруват, оксалоацетат та 2-оксоглутарат. Оскільки зазначені сполуки безперервно витрачаються в анаболічних процесах для формування структур мікроорганізму та його метаболітів, виникає потреба у поповненні їхнього внутрішньоклітинного пулу. У бактерій *B. megaterium* NBRC 15308 функціонують анаплеротичні реакції, спрямовані на відновлення концентрації цих метаболітів. Згідно з даними KEGG, однією з таких реакцій є карбоксилювання

фосфоенолпірувату з утворенням оксалоацетату, що каталізується ферментом фосфоенолпіруваткарбоксікіназою (КФ 4.1.1.49). (додаток 2)

Раніше було детально охарактеризовано будову молекули колагенази, та все ж таки нагадаємо, що це білкова сполука, яка складається з 17 амінокислот. [12] Розгляд біосинтезу амінокислот буде здійснено за родинами, класифікованими відповідно до їх метаболічних попередників:

1. Родина ароматичних амінокислот та гістидину (гістидин, фенілаланін, тирозин). Процес біосинтезу зазначених амінокислот розпочинається з пентозофосфатного шляху. На початковому етапі глюкозо-6-фосфат під впливом ферменту глюкозо-6-фосфатізомеразі (КФ 5.3.1.9) зазнає ізомеризації, перетворюючись на фруктозо-6-фосфат. Паралельно, з глюкозо-6-фосфату утворюються дві важливі сполуки: фосфорибозилпірофосфат (ця реакція каталізується рибозо-фосфат-пірофосфокіназою з номером КФ 2.7.6.1) та еритрозо-4-фосфат (утворення якого відбувається за участі ферменту транскетолази, КФ 2.2.1.1). Подальша трансформація фосфорибозилпірофосфату, що каталізується гістидинолдегідрогеназою (КФ 1.1.1.23), призводить до формування амінокислоти гістидину. Щодо синтезу фенілаланіну та тирозину, ключовими попередниками тут виступають фосфоенолпіруват (ФЕП) та еритрозо-4-фосфат. Їхня взаємодія, а саме конденсація, призводить до утворення проміжної сполуки, відомої як хоризмат. Цей етап каталізується ферментом хоризматсинтазою (КФ 4.2.3.5). У свою чергу, хоризмат піддається ізомеризації, перетворюючись на префенат. Цю реакцію здійснює фермент хоризматмутаза (КФ 5.4.99.5). На завершальній стадії біосинтезу префенат слугує безпосереднім субстратом для утворення фенілаланіну (ця трансформація відбувається за участі префенатдегідратази, КФ 4.2.1.51) та тирозину (синтез якого каталізується префенатдегідрогеназою, КФ 1.3.1.12).[41]

2. Піруватна родина об'єднує такі амінокислоти: серин, гліцин, цистеїн, аланін, валін та лейцин. Прекурсором для синтезу серину слугує 3-фосфогліцерат, який спочатку трансформується в 3-фосфосерин (згідно з KEGG [41], за участі фосфосеринамінотрансферази, КФ 2.6.1.52), а потім дефосфорилується до серину під дією фосфосеринфосфатази (КФ 3.1.3.3). У бактерій *B. megaterium* NBRC 15308 серин

є вихідною сполукою для синтезу гліцину (каталізується гліцингідроксиметилтрансферазою, КФ 2.1.2.1) та цистеїну. Для утворення цистеїну серин спочатку ацетилюється до О-ацетил-L-серину (фермент серин-О-ацетилтрансфераза, КФ 2.3.1.30), який згодом перетворюється на цистеїн (цистеїнсинтаза, КФ 2.5.1.47). Піруват, що утворюється в процесі гліколізу, окрім шляху перетворення на ацетил-КоА та залучення до ЦТК, також є безпосереднім попередником для синтезу аланіну, валіну та лейцину. Аланін синтезується з пірувату за допомогою ферменту аланіндегідрогенази (КФ 1.4.1.1), тоді як біосинтез валіну та лейцину забезпечується амінотрансферазою (КФ 2.6.1.42) [12,41,42]

3. Аспартатна родина амінокислот об'єднує аспартат (який не є складовою ферменту колагенази), аспарагін, лізин, метіонін, треонін та ізолейцин. Біосинтез цих амінокислот ініціюється з оксалоацетату, проміжного метаболіту циклу трикарбонових кислот (ЦТК), який під дією аспартатамінотрансферази (КФ 2.6.1.1) зазнає перетворення в аспартат. Подальші метаболічні шляхи, що відходять від аспартату, призводять до синтезу інших амінокислот цієї родини. Зокрема, лізин утворюється через проміжну сполуку – діамінопімелінову кислоту, а заключним етапом є декарбоксилювання, що каталізується діамінопімелатдекарбоксилазою (КФ 4.1.1.20). Синтез аспарагіну здійснюється ферментом аспарагінсинтазою (КФ 6.3.5.4). Утворення метіоніну та треоніну відбувається за участі ферментів 5-метилтетрагідрофолат - гомоцистеїн метилтрансферази (КФ 2.1.1.13), 5-метилтетрагідроптероїлтриглутамат - гомоцистеїн метилтрансферази (КФ 2.1.1.14) та треонінсинтази (КФ 4.2.3.1) відповідно. Варто зазначити, що у бактерій *B. megaterium* NBRC 15308 спостерігається утворення ізолейцину шляхом трансамінування треоніну, що каталізується амінотрансферазою (КФ 2.6.1.42). [12,41,42]

4. Насамкінець, розглянемо глутаматну родину амінокислот, до складу якої входять глутамат, глутамін, пролін та аргінін. Попередником цих амінокислот вважається 2-оксоглутарат, котрий, подібно до оксалоацетату, є інтермедіатом ЦТК. Накопичення глутамату (який не є структурним елементом цільового ферменту – колагенази) з 2-оксоглутарату каталізується ферментами глутаматдегідрогеназою (КФ 1.4.1.2) та глутаматдегідрогеназою (НАДФ+) (КФ 1.4.1.4). Глутамат виступає

безпосереднім попередником у синтезі решти амінокислот цієї родини. Зокрема, синтез глутаміну здійснюється за участі глутамінсинтетази (КФ 6.3.2.1), проліну – піролін-5-карбоксилатредуктази (КФ 1.5.1.2), а аргініну – через низку реакцій. На початковому етапі синтезу аргініну відбувається перетворення глутамату в аргініносукцинат під дією аргініносукцинатсинтази (КФ 6.3.4.5), який у подальшому розщеплюється до аргініну аргініносукцинатліазою (КФ 4.3.2.1). [12,41,42]

Отже, усі розглянуті амінокислоти, що продукуються *B. megaterium* NBRC 15308, є структурними компонентами цінного метаболіту – ферменту колагенази. Візуалізація шляху біотрансформації глюкози в колагеназу у *B. megaterium* NBRC 15308 представлена на *рис. 4.2*.

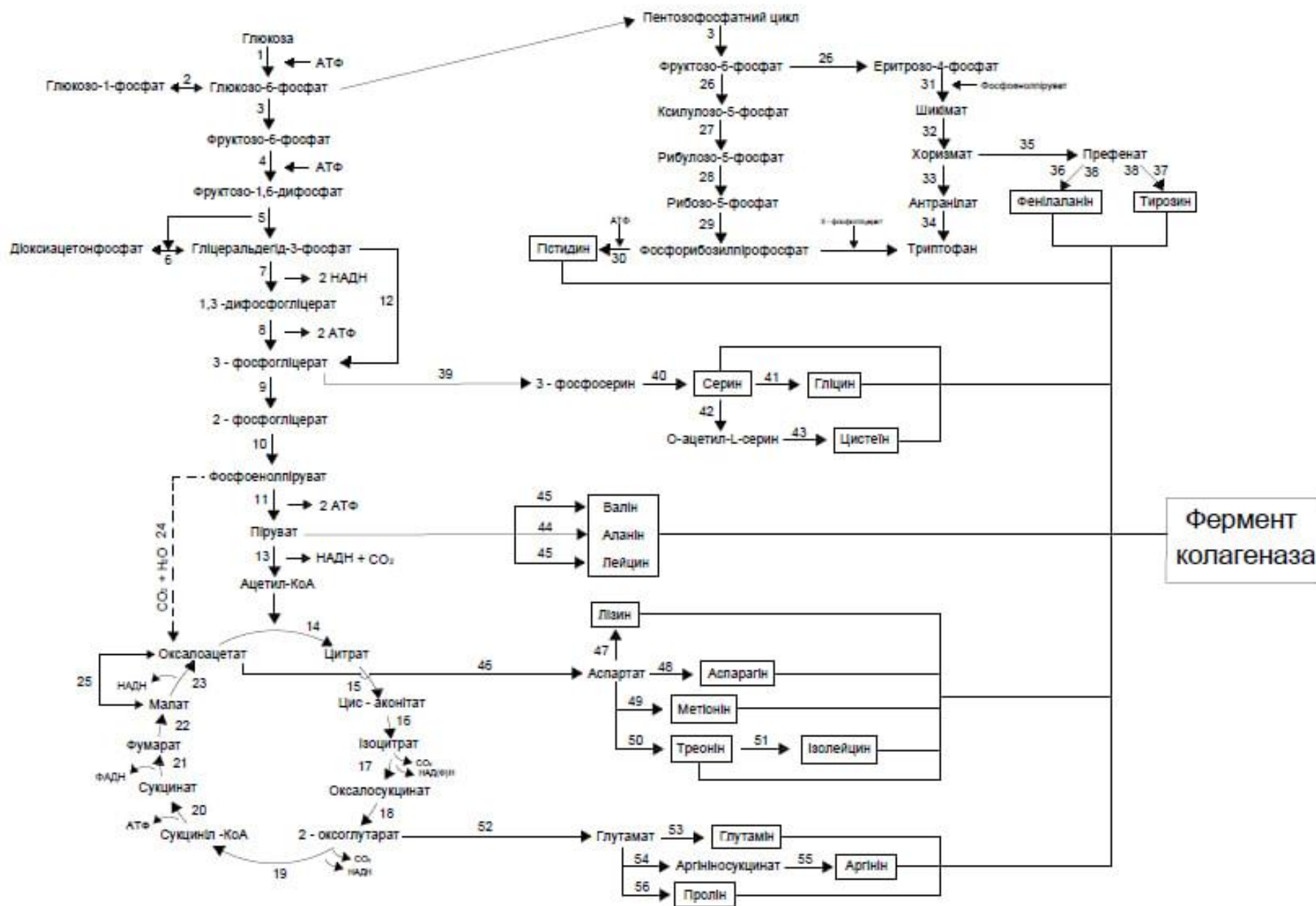


Рис. 4.2. Схема шляху біотрансформації глюкози в фермент колагеназу у бактерій *B. megaterium* NBRC 15308 згідно з KEGG

Ферменти : 1 - глюкокіназа (КФ 2.7.1.2); 2 - фосфоглюкомутаза (КФ 5.4.2.2); 3 - глюкозо-6-фосфат-ізомераза (КФ 5.3.1.9); 4 - фруктозо-1,6-бісфосфатаза III (КФ 3.1.3.11) та 6-фосфофруктокіназа 1 (КФ 2.7.1.11); 5 - фруктозо-бісфосфатальдолаза, клас II (КФ 4.1.2.13); 6 - тріозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); 7 - гліцеральдегід 3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12) та гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.59); 8 - фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 9 - 2,3-бісфосфогліцератзалежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11) та 2,3-бісфосфогліцератнезалежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12); 10 - енолаза (КФ 4.2.1.11); 11 - піруваткіназа (КФ 2.7.1.40); 12 - гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.9) 13 - піруватдегідрогеназа E1 (КФ 1.2.4.1) та піруватдегідрогеназа E2 (КФ 2.3.1.12); 14 - цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1); 15, 16 - аконітатгідратаза (КФ 4.2.3.1); 17, 18 - ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42); 19 - 2-оксоглутаратдегідрогеназа E1 (КФ 1.2.4.2) та 2-оксоглутаратдегідрогеназа E2 (КФ 2.3.1.61); 20 - сукциніл-КоА-синтетаза (КФ 6.2.1.5) та сукциніл-КоА:ацетат-КоА-трансфераза (КФ 2.8.3.18); 21 - сукцинатдегідрогеназа (КФ 1.3.5.1); 22 - фумаратгідратаза, клас I (КФ 4.2.1.2); 23 - малатдегідрогеназа (КФ 1.1.5.4); 24 - фосфоенолпіруваткарбоксикіназа (КФ 4.1.1.49); 25 - малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37); 26 - транскетолаза (КФ 2.2.1.1); 27 - рибулозофосфат-3-епімераза (КФ 5.1.3.1); 28 - рибоза-5-фосфат-ізомераза B (КФ 5.3.1.6); 29 - рибозо-фосфат-пірофосфокіназа (КФ 2.7.6.1); 30 - гістидинолдегідрогеназа (КФ 1.1.1.23); 31 - шикілатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.25); 32 - хоризматсинтаза (КФ 4.2.3.5); 33 - антранілатсинтаза (КФ 4.1.3.27); 34 - триптофансинтаза (КФ 4.2.1.20); 35 - хоризматмутаза (КФ 5.4.99.5); 36 - префенатдегідратаза (КФ 4.2.1.51); 37 - префенатдегідрогеназа (КФ 1.3.1.12); 38 - аспартатамінотрансфераза (КФ 2.6.1.1) та гістидинол-фосфатамінотрансфераза (КФ 2.6.1.9); 39 - фосфосеринамінотрансфераза (КФ 2.6.1.52); 40 - фосфосеринфосфатаза (КФ 3.1.3.3); 41 - гліцингідроксиметилтрансфераза (КФ 2.1.2.1); 42 - серин-О-ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.30); 43 - цистеїнсинтаза (КФ 2.5.1.47); 44 - аланіндегідрогеназа (КФ 1.4.1.1); 45 - амінотрансфераза амінокислот з розгалуженим ланцюгом (КФ 2.6.1.42); 46 - аспартатамінотрансфераза (КФ 2.6.1.1); 47 - діамінопімелатдекарбоксилаза (КФ 4.1.1.20); 48 - аспарагінсинтаза (КФ 6.3.5.4); 49 - 5-метилтетрагідрофолат - гомоцистеїн метилтрансфераза (КФ 2.1.1.13) та 5-

метилтетрагідроптероїлтриглутамат - гомоцистеїн метилтрансфераза (КФ 2.1.1.14);
50 - треонінсинтаза (КФ 4.2.3.1); 51 - амінотрансфераза (КФ 2.6.1.42); 52 -
глутаматдегідрогеназа (КФ 1.4.1.2) та глутаматдегідрогеназа (NADP⁺) (КФ 1.4.1.4); 53
- глутамінсинтетаза (КФ 6.3.2.1); 54 - аргініносукцинатсинтаза (КФ 6.3.4.5); 55 -
аргініносукцинатліаза (КФ 4.3.2.1); 56 - пірролін-5-карбоксилатредуктаза (1.5.1.2).

РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Промисловий біосинтез та культивування біологічних агентів є найважливішим етапом біосинтезу, що передбачає створення оптимальних умов, узгоджених з фізіолого-біохімічними характеристиками продуцента та вимогами до синтезу цільового продукту. Воно включає підготовку поживного середовища, інокуляту та регулювання параметрів середовища (температура, рН, аерація тощо) для забезпечення максимального виходу продукції.

Для біосинтезу ферменту колагенази було використано штам *B. megaterium* КМ 369985 — грамозитивний аеробний мікроорганізм, здатний до спороутворення. Ефективне функціонування цього продуцента потребує ретельно підбраного устаткування, адаптованого до його метаболічних потреб. Важливою умовою для забезпечення високої швидкості росту та максимальної активності синтезованої колагенази є безперервне надходження кисню. З цією метою до системи культивування інтегрують барботери — конструктивні елементи, що забезпечують рівномірну та ефективну аерацію. Використання стерильного стисненого повітря не лише сприяє підтриманню стабільного тиску в біореакторі, а й виступає бар'єром проти контамінації сторонніми мікроорганізмами, гарантуючи мікробіологічну чистоту процесу на всіх етапах виробництва. [30]

Оптимальні умови для росту *B. megaterium* КМ 369985 включають температуру на рівні 30 °С, при цьому мінімальна та максимальна температури росту варіюються в межах 3–15 °С та до 45 °С відповідно. З огляду на те, що дана температура разом із нейтральним значенням рН створює сприятливе середовище не лише для цільового штаму, а й для небажаної мікрофлори, виробничий процес стає чутливим до контамінації. Потрапляння сторонніх мікроорганізмів може призвести до зниження біосинтетичної активності продуцента, погіршення якості ферменту або навіть до повної втрати активних клітин. Тому передумовою ефективного культивування є

					НУХТ БТЕК 04.01.31 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Пархомова О.О.				РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Красінько В.О.						50	141
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

жорсткий контроль стерильності на всіх етапах виробництва. Стерилізація обладнання, трубопроводів і ємностей, зокрема інокуляторів, повинна проводитися ретельно та регулярно. Не менш важливою є стерильна підготовка поживного середовища та повітря, що подається для аерації, оскільки продуцент є облігатним аеробом. Крім цього, необхідно забезпечити високий рівень чистоти у виробничих зонах: здійснювати щоденне вологе прибирання, гігієнічне обслуговування виробничих площ, а також дотримуватися протоколів гігієни персоналу. Сукупність цих заходів мінімізує ризики мікробного забруднення та гарантує стабільність і якість технологічного процесу. [32,43,44]

У промисловій біотехнології часом виникає необхідність застосування режиму дозованого введення субстрату, відомого як культивування з підживленням. Такий підхід актуальний у випадках, коли висока початкова концентрація джерела вуглецю може спричинити катаболітну репресію — метаболічне явище, за якого клітини уповільнюють свій ріст через потребу адаптації, що подовжує лаг-фазу. Подібне зниження темпів росту негативно впливає на загальну продуктивність біосинтезу. У випадку використання штаму *B. megaterium* КМ 369985 для синтезу колагенази, вуглецевим субстратом є глюкоза в концентрації 20 г/л. Така кількість не створює ризику для розвитку катаболітної репресії, тому введення субстрату в режимі підживлення не є необхідним. [42]

У промисловості розглядаються два основні способи культивування мікроорганізмів — поверхневий і глибинний. Вибір методу визначається біологічними особливостями продуцента та вимогами до процесу. Поверхнєве культивування зазвичай застосовують для вирощування грибів на твердих середовищах, однак для бактерій, таких як *B. megaterium* КМ 369985, значно ефективнішим є глибинний метод. Його переваги очевидні: культивування відбувається в усьому об'ємі рідкого середовища, що дозволяє скоротити виробничі площі та уникнути потреби у масивному устаткуванні. Завдяки використанню мішалок забезпечується рівномірна циркуляція середовища і підвищується розчинення кисню, що важливо для аеробних мікроорганізмів. Крім того, глибинне культивування значно полегшує подальше виділення цільового продукту та біомаси,

а також дозволяє повністю автоматизувати процес, що є рекомендованим для промислових масштабів. [42,43]

З-поміж основних режимів мікробного культивування — періодичного та безперервного — вибір залежить насамперед від особливостей цільового продукту й фізіології продуцента. У випадку синтезу ферменту колагенази більш доцільним є використання періодичного режиму. Цей підхід забезпечує природний перебіг усіх фаз росту мікроорганізмів, дозволяючи точно відслідковувати момент, коли запускається та максимально активується біосинтез ферменту.

Періодичне культивування дозволяє простежити природну динаміку росту мікроорганізмів, яка включає кілька послідовних фаз: адаптації, активного поділу, баланс між ростом і відмиранням, фаза відмирання і виживання. Важливо, що хоча початок синтезу колагенази припадає на експоненційну фазу, саме стаціонарна фаза забезпечує максимальний вихід ферменту. Такий ефект пояснюється тим, що накопичення продукту метаболізму, зокрема у відповідь на наявність індуктора — колагену, активується в умовах обмеженого росту, коли клітини спрямовують енергетичні ресурси на вторинний метаболізм, а не на біомасу. До того ж, періодичне культивування дає можливість досягти майже повного споживання всіх компонентів поживного середовища, оскільки жодні нові порції субстрату не додаються під час процесу. Це сприяє зменшенню відходів і забезпечує більш повне використання ресурсів. Такий підхід є економічно вигідним і технологічно зручним, особливо у випадку ферментів, чутливих до змін умов або накопичення побічних продуктів. [42,43]

Вся вище наведена інформація, використовується для правильного підбору ферментаційної апаратури, які будуть оснащені всіма необхідними конструкційними елементами, по-типу перемішувального пристрою, барботеру, сорочки. Також, з кожним днем на ринку представлено все більше максимально автоматизованої апаратури (з сенсорними датчиками температури, рН, розчиненого кисню, тиску, швидкості обертання мішалки, піноутворення) що дозволяє мінімізувати присутність персоналу у виробничій ділянці. [42]

Перед початком виробничого процесу необхідно провести перевірку герметичності обладнання. Тестування здійснюють шляхом подачі стисненого повітря під тиском 0,07 МПа, а парові та матеріальні вентиля перевіряють на герметичність за допомогою пари. У разі виявлення витоків усувають дефекти та повторно виконують контроль. Після підтвердження відсутності пошкоджень та забезпечення герметичності проводять стерилізацію устаткування насиченою парою, яка подається через спеціальні форсунки або барботери. Процес починається при досягненні температури 126–132 °С (тиск 0,18–0,20 МПа) і триває протягом однієї години. [44]

Отже, підсумовуючи всю вищенаведену інформацію, зазначаємо характеристики біореактора, що пропонується використовувати для культивування *B. megaterium* КМ 369985:

1. Наявність системи барботажу стерильного повітря та турбінної мішалки - ефективного перемішування середовища і розподіл повітряних бульбашок, що сприяє покращенню газообміну і стимулює швидкий ріст клітин. Також необхідна система відведення відпрацьованих газів.

2. Для контролю рівня піни використовується механічне піногасіння — мішалка у верхній частині апарату. Хімічні піногасники (синтетичні або жирові) в нашому випадку застосовувати не рекомендується, аби уникнути зміни рН та додаткової корекції титрувальними розчинами.

3. Наявність сорочки — для здійснення повноцінної стерилізації апарату, підігріву середовища, та в разі потреби охолодження (оборотна водою).

4. Хоч і не передбачається корекція рівня рН титрувальними розчинами, наявність датчика рН не буде зайвим. Також в сучасних автоматизованих апаратах спостерігається наявність датчика pO_2 та датчика рівня рL. [43,44]

5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Забезпечення ефективного біосинтезу колагенази за участі *B. megaterium* КМ 369985 — облигатного аеробного мікроорганізму — важливим є постійне надходження стерильного кисневмісного газового середовища. Стерильність поданого повітря необхідна як і в процес культивування, так і в обслуговуючих виробничих зонах,

оскільки навіть незначне мікробне забруднення може призвести до пригнічення росту продуцента, зменшення метаболічного профілю та істотного зниження біосинтетичної активності. Відповідно, підтримання асептичних умов є вагомим вимогою до аеробного ферментаційного процесу.

Сьогодні відомо чимало способів знезараження повітря, що забезпечують ефективне усунення або нейтралізацію мікроорганізмів. До таких методів належать як фізичні, так і хімічні підходи, вибір яких визначається особливостями конкретного технологічного процесу. Зокрема, у лабораторних умовах та у боксах для асептичної роботи (наприклад, під час приготування посівного матеріалу) широко застосовується ультрафіолетове опромінення. УФ-лампи зазвичай вмикають за 1–2 години перед робочими процесами, з вимогою – відсутності персоналу, оскільки під дією випромінювання в повітрі можуть утворюватися токсичні гази — озон та оксиди азоту. Тому паралельно необхідно забезпечити достатню вентиляцію, що сприяє видаленню цих небезпечних домішок і підтримує безпечні умови праці. [45]

Однак найбільш поширеним і традиційним методом стерилізації повітря, що безпосередньо використовується в процесі культивування залишається фільтрація через мембрани з різних фільтрувальних матеріалів, що забезпечує ефективне очищення повітря від мікроорганізмів та механічних частинок. [45] Очищення аераційного повітря здійснюється за наступною багатоетапною схемою:

1. Атмосферне повітря для виробничих потреб зазвичай відбирається через спеціальний забірний пристрій, розміщений на висоті 2–3 метри вище найвищої конструктивної точки будівлі. Враховуючи, що висота біореактора об'ємом 0,15 м³ становить приблизно 1,79 м, можна припустити, що приміщення має один поверх. Відповідно, повітрязабір доцільно здійснювати з висоти близько 10 метрів, що дозволяє мінімізувати ризик надходження аероконтамінантів, адже повітря на такій висоті характеризується нижчим рівнем забруднення. [46]

2. Первинне очищення повітря за допомогою фільтрів грубого ступеня — цей етап спрямований на видалення великих зважених частинок та мікроорганізмів до подачі повітря в компресор, з метою запобігання його механічному зносу та зниженню ризику вторинної контамінації. Для цього використовують касетні фільтри

типу ФЯП (рис. 5.1.а) з наступними характеристиками: висота, ширина – 514 мм, граничний тиск – 60 Па, продуктивність – 1540 м³/год, матеріал корпусу – пінополіуретан, маса – 3,4 кг [47]

Як фільтрувальний матеріал для попереднього очищення повітря пропонуємо використовувати – пінополіуретан (рис. 5.1.б), який має такі характеристики, як: пилоємність – 200 г/м³, ефективність очищення - 50-85%, тривалість однократного використання складає 3-4 місяці. [45]

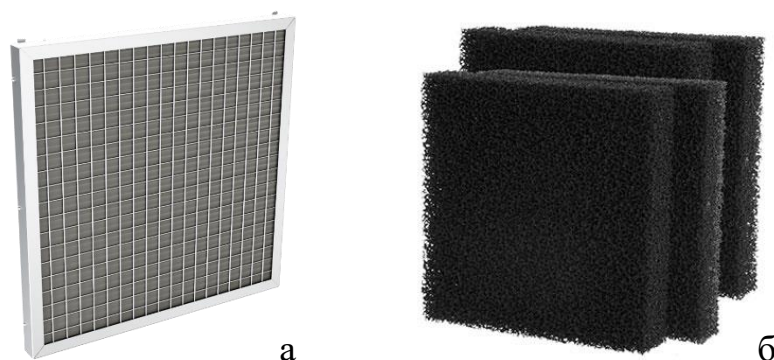


Рис.5.1. Фільтр грубого очищення (а) та фільтрувальний матеріал – пінополіуретан (б) [45,47]

3. Стискання повітря за допомогою турбокомпресора — виконує низку важливих функцій у системі підготовки стерильного повітря. Перш за все, стиснення забезпечує необхідний тиск для подолання гідродинамічного опору фільтраційної установки та стабільну подачу повітря в біореактор з метою підтримання аеробного режиму культивування. Додатково, створення робочого тиску в межах 0,13–0,14 МПа сприяє формуванню сприятливих умов для проліферації продуцента та синтезу цільового ферменту. Варто зазначити, що внаслідок швидкого стискання повітря нагрівається до температури 120–250 °С, що додатково знижує ймовірність мікробного забруднення повітряного потоку. [45,47]

4. Внаслідок компресування повітря відбувається підвищення його вологості, що спричиняє конденсацію вологи на поверхні фільтраційних матеріалів. Це створює сприятливе середовище для розмноження мікроорганізмів, а також призводить до деградації фільтраційної структури: склеювання волокон та утворення макропор, через які можливий транзит мікробних клітин. З метою мінімізації цього

ризиком оптимальним інженерним рішенням буде включити в систему теплообмінник-охолоджувач, що стабілізує температуру повітря в межах 25–40 °С, а також ресивер, який сприяє осадженню вологи та знижує пульсації. [45,48]

5. З метою забезпечення ефективної роботи фільтрів тонкого очищення, повітря проходить стадію підігріву. Після виходу з ресивера воно спрямовується до теплообмінника, де температура доводиться до 70–90 °С. Такий тепловий режим запобігає конденсації вологи на фільтрувальному матеріалі, що дозволяє уникнути його передчасному зношенню та забезпечує надійну бар'єрну функцію системи очищення. [48]

6. Наступною стадією є подача повітря на фільтри головного очищення, що монтується безпосередньо поблизу виробничої зони ферментації. На цьому етапі застосовують глибинні фільтраційні системи з високою сорбційною здатністю, в яких як фільтрувальне середовище використовуються волокнисті матеріали, зокрема скловолокно, базальтове чи целюлозне волокно. Доцільним є впровадження кишенькових фільтрів типу ФВКОМ F9 (рис. 5.2), які характеризуються високою ефективністю затримання мікрочастинок та біологічних агентів: фільтрувальний матеріал – мікроскловолокно, матеріал рамки – пластик/оцинкована сталь, робоча температура – 65-80°C, вологостійкість – 90-100% [49]



Рис.5.2. Кишеньковий фільтр головного очищення типу ФВКОМ F9 [49]

7. Фінальний етап підготовки стерильного повітря передбачає використання фільтрів індивідуального очищення, які встановлюються безпосередньо перед ферментером та посівними апаратами. Після проходження крізь фільтри головного очищення, що видаляють до 98% завислих частинок, повітря спрямовується на тонке

очищення. На цьому етапі усуваються залишкові 2% контамінантів, зокрема мікроорганізми та дрібнодисперсні включення. Для забезпечення стерильності рекомендується застосовувати фільтри Ultradept II P-SRF (рис. 5.3), які забезпечують високий ступінь фільтрації завдяки використанню багатошарової структури з мікрОВОЛОКОН: ступінь очищення – 99,99998% (відносно частинок 0,01 мкм), фільтрувальний матеріал – боросилікат, температурний діапазон – від -20°C до +200°C [50]



Рис.5.3. Повітряний фільтр індивідуального очищення типу Ultradept II P-SRF [50]

Фільтрувальні елементи піддаються стерилізації шляхом обробки гострою парою при температурному режимі 125–130 °С з подальшим сушінням гарячим повітрям для забезпечення відсутності біологічних забруднень. В процесі виробництва здійснюється безперервне відведення відпрацьованого повітря, що підлягає багатоетапній очистці з метою мінімізації викидів летких органічних сполук (альдегідів, кетонів, спиртів, ефірів) та аерозольних часток культуральної рідини, здатних містити клітини продуцента. Для очищення застосовуються фільтрувальні системи, ідентичні головним стадіям фільтрації. [48]

5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва ферменту колагенази бактеріями *Bacillus megaterium* КМ 369985

У сучасній біотехнологічній індустрії надзвичайно важливе значення має забезпечення мікробіологічної чистоти, адже саме вона є запорукою стабільного перебігу біосинтетичних процесів і досягнення високої продуктивності. Навіть незначна контамінація може призвести до зниження життєздатності клітин, зменшення активності ферментів та зменшення виходу кінцевого продукту. Тому дотримання стерильних умов є пріоритетним. Застосування сучасних методів

стерилізації й дезінфекції дозволяє ефективно контролювати мікробну забрудненість виробничого середовища, мінімізуючи втрати сировини та підвищувати загальну технологічну ефективність. Підготовчі етапи виробництва включають ретельне очищення приміщень і обробку відповідно підібраними мийними та дезінфекційними засобами, які обираються з урахуванням специфіки виробничого процесу та вимог до безпеки.[51,52]

5.3.1. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів

Мийні засоби. «Каустична сода» (гідроксид натрію) - використовується як ефективний лужний мийний засіб для очищення внутрішніх поверхонь технологічного обладнання після завершення етапу культивування. Оскільки поживні середовища, що застосовуються у виробництві, часто містять білки, жири та інші складні органічні сполуки, їх повне видалення під час миття може викликати труднощі. Саме тому доцільно застосовувати розчини каустичної соди, яка володіє високою очищувальною здатністю та добре справляється з залишковими забрудненнями. Також засіб активний проти широко спектру бактерій, плісняви та навіть вірусів. У виробничих умовах зазвичай використовують 1% водні розчини. Враховуючи високу хімічну активність цього засобу, під час його застосування персонал зобов'язаний дотримуватися правил безпеки і використовувати відповідні засоби індивідуального захисту. Зберігати засіб потрібно в оригінальній упаковці, термін придатності один рік. [53]

«Чистолайн-універсал» — багатофункціональний засіб, призначений для одночасного миття й дезінфекції різноманітних поверхонь, включаючи внутрішні поверхні виробничого обладнання. Склад препарату характеризується речовинами (*табл. 5.1*), які забезпечують високу мийну здатність, ефективне видалення органічних забруднень без їх фіксації на поверхні та нейтралізацію неприємних запахів. Засіб класифікується як малонебезпечний, тобто в повітрі засіб не повинен перевищувати - 10 мг/м^3 - 4 клас небезпеки. Для обробки обладнання зазвичай застосовують 1% розчин, який готують на основі звичайної водопровідної води. Час миття становить приблизно 15 хвилин, після чого поверхні обов'язково промивають

чистою водою. Підготовлений робочий розчин зберігається до 14 діб у щільно закритому контейнері при кімнатній температурі. [54]

Дезінфікуючі засоби. «Дезанол екстра» — багатофункціональний дезінфікуючий засіб, який поєднує антисептичну дію з високими мийними властивостями. У його складі містяться активні компоненти (*табл. 5.1*), завдяки яким препарат ефективно знищує широкий спектр мікроорганізмів. Розчин прозорий, має легкий запах, добре змішується з водою та рівномірно покриває оброблювані поверхні. Його можна безпечно використовувати для дезінфекції матеріалів різного типу. У практиці зазвичай застосовують 0,1% водний розчин, який наносять у кількості 50–100 мл на 1 м². Час дії становить 10 хвилин. Для приготування розчину використовують водопровідну воду (25°C- 27°C). Приготовлені розбавлені засоби використовуються протягом 35 діб, а після використання його дозволено зливати в каналізаційну мережу. [56]

«Террацид Айсід» — універсальний дезінфекційний засіб, рекомендований для використання в промислових умовах для очищення та знезараження різноманітних поверхонь у виробничих приміщеннях. Препарат має жовтувато-зелений колір і слабколужну реакцію (рН до 8,5), що сприяє ефективній дії без агресивного впливу на матеріали. Засіб поєднує потужні дезінфекційні та мийні властивості, добре справляється з органічними забрудненнями та знезаражує поверхні від широкого спектру мікроорганізмів. Його можна застосовувати на будь-яких типах покриттів — від металевих і пластикових до керамічних та пофарбованих. Для санітарної обробки приміщень виробник рекомендує використовувати 0,5% водний розчин із часом експозиції 5 хвилин. Засіб належить до малонебезпечних для людини, тому його використання не потребує спеціальних заходів безпеки, окрім стандартних засобів індивідуального захисту. [58]

«Даноксин спеціаль» — це дезінфекційний засіб, рекомендований для очищення та знезараження поверхонь у приміщеннях біотехнологічного виробництва. Його особливістю є форма випуску: засіб постачається у вигляді порошку (розчинність висока у воді). Як результат отримуємо готовий розчин з лужним рН — близько 10. Препарат поєднує мийні, дезінфікуючі та емульгуючі властивості,

забезпечуючи ефективне видалення органічних забруднень. Добре взаємодіє з більшістю типів поверхонь, окрім мідних та латунних, і не рекомендований до використання у комбінації з альдегідвмісними препаратами. Робочий розчин готують у концентрації 0,25%, з експозицією 15 хвилин. Засіб належить до безпечних для персоналу, не потребує спеціальних умов застосування. [60] Деталізована характеристика мийних та дезінфікуючих засобі наведена у *табл. 5.1*.

Засоби для дезінфекційної обробки рук обслуговуючого персоналу.

«Blanidas soft des» — в'язкий дезінфекційний препарат світло-зеленого кольору, призначений для гігієнічної антисептики шкіри рук обслуговуючого персоналу, що задіяний в біотехнологічному процесі, включаючи обробку поверхні рукавичок. Антимікробна активність засобу обумовлена вмістом триклозану (5-хлор-2-(2,4-дихлорфеноксі)фенолу) — фенольного похідного з вираженими бактерицидними властивостями проти багатьох мікроорганізмів (позитивних і негативних за Грамом). Препарат характеризується низьким рівнем токсичності, належить до 4 класу малонебезпечних речовин відповідно ($\text{ГДК} > 10 \text{ мг/м}^3$), а також проявляє зволожувальні властивості в разі застосування на шкіру рук. Згідно з регламентованим протоколом застосування, рекомендовано наносити 3 мл засобу на зволожену шкіру рук, рівномірно розподіляючи та втираючи протягом не менше 30 секунд, після чого здійснюється змивання водою та осушування шкіри одноразовим рушником. [62]

«AHD 2000 express» — це високоякісний антисептичний засіб, розроблений для надійного й зручного догляду за шкірою рук. Його склад базується на поєднанні спиртових компонентів (пропіловий та ізопропіловий спирти) і додатково збагачений катіонним антисептиком — алкілдиметилбензиламоній хлоридом, що забезпечує комплексну дію проти широкого кола мікробіоти. Засіб проявляє високу ефективність проти бактерій (у тому числі таких збудників, як туберкульозна паличка, кишкова паличка, синьогнійна паличка, сальмонели), грибків та вірусів. Завдяки добре збалансованій формулі, препарат не тільки дезінфікує, але й дбайливо ставиться до шкіри: не пересушує її, не порушує природного гідроліпідного балансу та не створює відчуття дискомфорту навіть при тривалому використанні. Окрім цього, засіб не

спричиняє надмірного накопичення вологи під рукавичками, що особливо важливо для персоналу, який працює в захисному одязі протягом тривалого часу. «АНД 2000 express» належить до 4 класу малонебезпечних речовин ($\text{ГДК} > 10 \text{ мг/м}^3$) та не виявляє мутагенних або канцерогенних ефектів, тощо. Застосування не потребує складних процедур: достатньо нанести 3 мл засобу на шкіру рук і ретельно втирати протягом 15 секунд для досягнення необхідного антисептичного ефекту. [63]

Узагальнена характеристика мийних та дезінфікувальних засобів

Назва засобу	Склад	Антимікробна дія	Характеристика	Сумісність з оброблюваними поверхнями	Спосіб застосування (концентрація робочого розчину)	Відомості про державну реєстрацію	Вартість	Джерело
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Мийні засоби								
Каустична сода (виробник ТОВ «АВТ ТРЕЙД»)	Натрій гідроксид 100%	Бактеріальна мікрофлора, пліснява, віруси	Засіб у вигляді білих гранул, що має виражені миючі властивості щодо органічних речовин, зокрема білків та жирів. Видаляє найскладніші забруднення (навіть біоплівку) та не залишає нальоту. Речовина гігроскопічна	Пропонується використовувати для миття обладнання, що виготовлене з нержавіючої сталі – засіб сумісний. Проте такі поверхні як мідь, латунь алюміній обробляти не варто.	1. Попереднє промивання водопровідною водою. 2. Розчинення гранул у теплій воді – миття 1% робочим розчином – 10-15 хв. 3. Ополіскування чистою водою.	Даний миючий засіб не внесено до Державного реєстру.	105 грн за 1 кг	[53]
«Чистолاین-універсал» (виробник ТОВ «М Д М»)	Аніонні ПАР <15%; амфотерні ПАР <5%; неіоногенні ПАР <5%; 2-феноксіетанол - 1%; натрію хлорид, ЕДТА; ароматизатор; 2-бром-2-нітропропан-1,3-діол	Грамположитивні, грампегативні бактерії, мікроміцети, віруси	Рідкий очищувальний засіб без кольору, відзначається високою мийною здатністю. Не спричиняє закріплення органічних або неорганічних залишків на поверхні, ефективно видаляє забруднення органічного походження.	Завдяки хімічній інертності до конструкційних матеріалів, засіб демонструє повну сумісність з різними типами поверхонь.	1. Попереднє промивання водопровідною водою. 2. Миття 1% робочим розчином – 15 хв. 3. Ополіскування чистою водою.	Продукт має державну реєстрацію за 2025 рік. Дата внесення: 07.09.2020. Термін дії до 07.09.2025	924 грн за 5 л	[54,55]

Продовження табл. 5.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Дезінфікуючі засоби								
«Дезанол екстра» (виробник ТОВ «Ордема»)	N,N-диметил-N-алкіл(C6-18)-бензолметанаміній хлорид 13,0%-23,0%; N-(3-амінопропіл)-N-додецил-1,3-діамін 15,0%-20,0%;	Бактерії та міцеліальна мікрофлора, віруси, спори	Прозорий дезінфектант з миючим та змочувальним ефектом, високорозчинний у воді, має відмінні детергентні властивості щодо будь-яких забруднень, добре змивається водою, несумісний з аніонактивними ПАВ.	Демонструє сумісність з найпоширенішими типами поверхонь, а саме :метали, пластик, гума, кераміка, дерево, гальванічні покриття	1.Дезінфекція 0,1% робочим розчином – 10 хв. 2.Ополіскування чистою водою кімнатної температури 3.Норма витрати - 50 -100 мл/м ² .	Продукт має державну реєстрацію за 2025 рік. Дата внесення: 27.11.2020. Термін дії до 27.11.2025	2400 грн за 5 л	[56,57]
«Террацид айсід» (виробник ТОВ «ДАНА МЕДІКАЛ»)	1,3-пропандіамін, додецилдіпропілен-триамін — 1,8%, алкілC ₁₂₋₁₈ - диметилбензиламоній хлорид — 10%, молочна кислота – 10,0%	Бактерицидна, віруліцидна, спороцидна та фунгіцидна активність	Засіб являє собою рідину (прозора) з вираженими дезінфекційними властивостями. Колір препарату може змінюватися від світло-жовтого до світло-зеленого відтінку. Препарат має добре виражені мийні та емульгуючі властивості. Значення рН робочого розчину знаходиться в межах 7,5–8,5. Використання з аніонними поверхнево-активними речовинами та милами заборонене, оскільки це може знизити ефективність засобу.	Засіб сумісний із матеріалами різного походження, як штучними, так і натуральними, не викликаючи їх пошкодження або деградації під час застосування.	1.Дезінфекція 0,5% робочим розчином – 5 хв. 3.Ополіскування чистою водою (в разі потреби можна не змивати). 4.Норма витрати - 50 -100 мл/м ² .	Продукт має державну реєстрацію за 2025 рік. Дата внесення: 01.07.2020. Термін дії до 01.07.2025	585 грн за 1 л	[58,59]

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Дезінфікуючі засоби								
«Даноксин спеціаль» (виробник ТОВ «ДАНА МЕДІКАЛ»)	Перкарбонат-натрію – 15,0—18,0%; полі (гексаметиленбігуанід) гідрохлорид – 0,4-0,5%, може містити неіоногенні ПАР	Бактерицидна, віруліцидна, спороцидна та фунгіцидна активність	Засіб має вигляд білого порошку з майже нейтральним запахом. Після розчинення у воді робочі розчини характеризуються лужною реакцією середовища. Препарат проявляє мийні, емульгуючі та дезодоруючі властивості, при цьому утворює слабку піну. Ефективно видаляє органічні забруднення, а також біоплівки. Добре розчиняється у воді та легко змивається з оброблюваних поверхонь. Виробник не рекомендує застосовувати засіб у комбінації з іншими препаратами, що містять альдегіди, через можливу хімічну несумісність.	Характеризується універсальністю застосування на таких поширених типах поверхонь, як металеві, пластикові, гумові, керамічні, дерев'яні, тощо.	1.Розчинення засобу у воді (18°C-40°C) протягом 10-15 хв. 2.Дезінфекція 0,25% робочим розчином – 15 хв. 3.Ополіскування чистою водою (в разі потреби можна не змивати) 4. Норма витрати - 50 -100 мл/м ² .	Продукт має державну реєстрацію за 2025 рік. Дата внесення: 01.07.2020. Термін дії до 01.07.2025	3120 грн за 5 кг	[60,61]

5.3.2. Розрахунок витрат мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва ферменту колагенази бактеріями *Bacillus megaterium* КМ 369985

Для визначення витрат що спрямовуються на санітарно-гігієнічну обробку виробничих приміщень та обладнання, що застосовується для біосинтезу ферменту колагенази з використанням *B. megaterium* КМ 369985 необхідний попередній етап ескізного планування зон виробничого простору.

Таким чином, на початковому етапі досліджень було розроблено ескізний план виробничого приміщення (ілюстрований на *рис. 5.4*), що охоплює ключові технологічні елементи. До їх числа належать: інокулятор, позначений як І-9, реактор-змішувач (Р-11), просторове розташування якого визначено на висоті 2,6 м відповідно до технології виробничого процесу, а також біореактор (ФР-14).

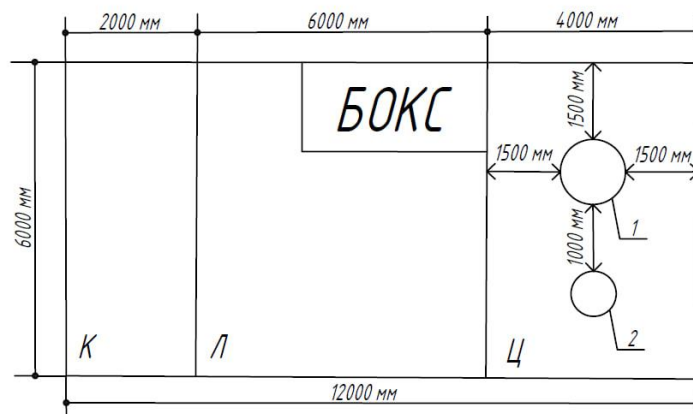


Рис. 5.4. Ескіз плану виробничого середовища для виробництва ферменту колагенази бактеріями *B. megaterium* КМ 369985 (Ц – цех виробничого біосинтезу та отримання інокуляту (1 – ферментер (ФР-14) об'ємом 150 л, 2 – інокулятор (І-9) об'ємом 15 л), Л – мікробіологічна лабораторія, К – приміщення з качалками)

При просторовому розміщенні згаданого обладнання було враховано необхідність забезпечення безперешкодного доступу (1 м між одиницями обладнання та 1,5 м до стін) до всіх функціональних компонентів і комунікаційних мереж для ефективного проведення санітарної обробки, монтажних та ремонтних процедур. Зазначені параметри, безпосередньо використовуються для подальшого визначення площ приміщення та поверхонь, що підлягають санітарній обробці. Також значну частину виробничого приміщення займає мікробіологічна лабораторія (з обладнанням для комплексного аналізу культуральної рідини), а також приміщення з

качалками. В *табл. 5.2* наведено перелік основних габаритних характеристик устаткування, задіяного в технологічному процесі. [46, 64,65]

Таблиця 5.2

Габаритні розміри виробничого устаткування для біосинтезу ферменту колагенази бактеріями *B. megaterium* КМ 369985

Виробниче обладнання	Геометричний об'єм, л	Діаметр, м	Висота, м
Ферментер (ФР-14)	150	0,4	1
Реактор-змішувач (Р-11) для приготування композиції А	10	0,25	0,45
Інокулятор (І-9)	15	0,27	0,5
Всього	175		

Біосинтез ферменту колагенази здійснюється впродовж 3 місяців (90 днів). Протягом цього часу, щоденно здійснюється прибирання що включає прибирання, миття та дезінфекцію поверхонь у приміщенні, зокрема й підлогу. Таким чином на один день припадає 1 прибирання (90 разів миється підлога).

Генеральне прибирання, що здійснюється рідше, а саме з періодичністю раз на 25 днів (4 рази за 90 діб), включає миття та дезінфекцію не лише підлоги, але й вертикальних поверхонь, а саме стін, вікон і дверей виробничої зони (цеху) а також приміщення обертовими струшувачами і звісно мікробіологічну лабораторію. Для точного розрахунку витрат мийних і дезінфікуючих засобів необхідно визначити загальну площу підлоги та стін, що підлягають санітарній обробці протягом всієї виробничої діяльності підприємства.

Власне, розрахункова площа підлоги цеху (де встановлено біореактор та інокулятор) розрахована як: $24 \text{ м}^2 = 6 \text{ м}^2 * 4 \text{ м}^2$, в той час як площа стін цього ж приміщення розраховується як: $120 \text{ м}^2 = [(4 \text{ м}^2 * 6 \text{ м}^2) + (6 \text{ м}^2 * 6 \text{ м}^2)] * 2$. Аналогічно до цього розрахунку встановлюється площа підлоги та стін інших задіяних в процесі приміщень. Для зручності всі дані про загальні площі санітарно-гігієнічної обробки подано в *табл. 5.3*.

Розрахунок загальної площі санітарної обробки виробничих приміщень

Приміщення	Площа підлоги, м ²	Площа стін, вікон, дверей, м ²	Загальна площа, м ²
Цех виробничого біосинтезу та вирощування інокуляту	24	120	144
Мікробіологічна лабораторія	36	144	180
Приміщення з качалками	12	96	108
Загальна площа	72	360	432

Наступним кроком буде розрахунок загального об'єму миття устаткування, який можна розрахувати знаючи кількість циклів біосинтезу ферменту колагенази:

$$N_{\text{цк}} = 24 \cdot T_{\text{рд}} / T_{\text{цф}} = 24 \cdot 90 / 80,5 = 27 \text{ циклів}$$

Зауважимо, що здійснюється ще один етап миття обладнання після виробничого процесу культивування бактерій *B. megaterium* КМ 369985. Загалом виходить 28 етапів миття обладнання. Можемо розрахувати загальний об'єм миття обладнання:

$$175 \text{ л} \cdot 28 = 4900 \text{ л (або 4,900 м}^3\text{)}$$

З метою підвищення зручності аналізу даних, узагальнена інформація щодо розрахунку площі миття та дезінфекції виробничих приміщень та обладнання, протягом усього виробничого циклу представлена в табл. 5.4.

Розрахунок загальної площі миття та дезінфекції об'єкту обробки за весь період виробництва ферменту колагенази *B. megaterium* КМ 369985

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) об'єкту обробки, м ² (м ³)	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, м ² (м ³)
Обладнання	175	28	4,900
Підлога	72	90	6480
Стіни, вікна, двері	360	4	1440

З огляду на використання СІР-мийки для очищення технологічного устаткування, середній об'єм споживаного робочого розчину становить 20–30% (прийємо 30%) від його номінальної місткості. Таким чином, можемо розрахувати

скільки потрібно витратити робочого приготовлених розчинів для обробки обладнання після ферментації складуть:

$$4,900 \text{ м}^3 * 0,30 = 1470 \text{ л}$$

В *табл. 5.5* наведено узагальнюючі параметри, що визначають вибір оптимального мийного та дезінфікуючого засобу. Процес відбору ґрунтується не лише на відповідності засобів встановленим вимогам (розглянутим вище), але й на їх витратах, необхідних для санітарної обробки певної площі або об'єму. Як правило, для дезінфекції поверхонь застосовують у середньому 100 мл готових засобів на 1 м², тобто для обробки 7920 м² необхідно буде:

$$7920 * 0,1 = 792,0 \text{ л засобу.}$$

Аналізуючи дані, наведені в *табл. 5.5*, встановлено, що мийний засіб «Каустична сода» є економічно найбільш вигідним серед розглянутих варіантів. Враховуючи його ефективні мийні властивості, доцільно застосовувати цей засіб для очищення внутрішніх поверхонь виробничого обладнання.

Серед дезінфікуючих засобів оптимальним є застосування «Дезанол екстра». Він демонструє високу бактерицидну, фунгіцидну віруліцидну та спороцидну активність, а також забезпечують економічну ефективність протягом усього виробничого біосинтезу (3 місяці) ферменту колагенази, синтезованого бактеріями *B. megaterium* КМ 369985. Однак, з метою запобігання розвитку адаптаційних механізмів та формування резистентності мікроорганізмів до активних компонентів засобу, рекомендовано періодично змінювати дезінфекційний засіб на інший (раз на 1–3 місяці). Як альтернатива «Дезанол екстра», доцільно використовувати «Даноксин спеціаль», що є економічно доцільнішим порівняно з «Террацид айсід».

5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Біосинтез у виробничих умовах охоплює не лише етап отримання ПМ, а й комплексну підготовку поживного середовища. Цей процес включає складання відповідних композицій та їх подальшу стерилізацію з метою запобігання мікробному забрудненню. Ретельний розподіл компонентів поживного середовища має принципове значення, оскільки кожна речовина вимагає дотримання

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва ферменту колагенази бактеріями *B. megaterium* КМ 369985

Назва мийного/дезінфікувального засобу (діюча речовина)	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (л)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн***	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
Каустична сода (луг NaOH)	Обладнання (CIP-мийка)	1	4900	1470	105	1,05	1543,5
«Чистолайн-універсал» (ПАР*, 2-феноксіетанол)	Обладнання (CIP-мийка)	1	4900	1470	184,8	1,9	2793,0
«Дезанол екстра» (ЧАС**, алкіламін, ПАР*)	Приміщення, зовнішні поверхні обладнання	0,1	7920	792	480	0,48	380,5
«Террацид айсід» (молочна кислота, аміни, ПАР*)	Приміщення, зовнішні поверхні обладнання	0,5	7920	792	585	2,93	2320,6
«Даноксин спеціаль» (перкарбонат натрію, гуанідин)	Приміщення, зовнішні поверхні обладнання	0,25	7920	792	624	1,56	1235,5

*ПАР-поверхнево-активна речовина, **ЧАС-четвертинна амонієва сполука, *** ціни наведені станом на 4.05.2025 р.

індивідуального температурного режиму стерилізації. Крім того, під час приготування необхідно враховувати можливі хімічні взаємодії між окремими компонентами, що можуть вплинути на здатність засвоювання цих компонентів мікроорганізмами.

Для отримання ферменту колагенази з допомогою штаму *B. megaterium* КМ 369985 будемо використовувати ПС з таких важливих компонентів (г/л): глюкоза – 20, пептид колагену I типу – 10, CaCl_2 - 0,05, NaH_2PO_4 - 0,5, K_2HPO_4 - 0,5 г/л. [26]

Як було вище розраховано, для культивування використаємо ферментаційне обладнання об'ємом $0,15 \text{ м}^3$ з коефіцієнтом заповнення 0,6 в якому робочий об'єм складає $0,09 \text{ м}^3$. До нього також додається обладнання для підготовки інокуляту для виробничого біосинтезу, а саме інокулятор об'ємом $0,015 \text{ м}^3$. Поживне середовище, що використовується в даному процесі готується для 3 різних етапів, а саме:

1. Культивування в качалочних колбах $0,75 \text{ л}$.
2. Культивування в інокуляторі об'ємом $0,015 \text{ м}^3$
3. Біосинтез у ферментері об'ємом $0,15 \text{ м}^3$

Проаналізувавши склад вище наведено ПС для бактерій *B. megaterium* КМ 369985, формуємо композиції:

Композиція А: глюкоза, пептид колагену I типу (умови термічної обробки: температура складає 112°C - 115°C , тиск встановлено на $0,05 \text{ МПа}$, тривалість процесу 20-30 хвилин).

Композиція Б: CaCl_2 , NaH_2PO_4 , K_2HPO_4 (умови термічної обробки: температура складає - 131°C , тиск встановлено на $0,15 \text{ МПа}$, тривалість процесу 40-60 хвилин).

Дані композиції були сформовані на основі нижче наведеної інформації:

1. Термолабільність компонентів. Відомо, що глюкоза та пептид колагену I типу (який є білком) – це термолабільні компоненти, відповідно для їх стерилізації повинні бути створенні більш м'які умови ніж для солей, які в свою чергу витримують високі температури протягом тривалого часу. Глюкоза готується як 40% максимально концентрований розчин, оскільки є універсальним джерелом вуглецю який споживається практично всіма мікроорганізмами, тому для унеможливлення контамінації пропонуємо приготувати такий висококонцентрований розчин. В статті [26] зазначено, що для культивування даного біологічного агенту використовується

пептид колагену I типу (TC343-10G). Пептид колагену I типу є гідролізованою формою колагену, який є легкокорозчинним у воді та не утворює плівки на поверхні води. [66]

2. Термолабільність компонентів. Відомо, що глюкоза та пептид колагену I типу (який є білком) – це термолабільні компоненти, відповідно для їх стерилізації повинні бути створенні більш м'які умови ніж для солей, які в свою чергу витримують високі температури протягом тривалого часу. Глюкоза готується як 40% максимально концентрований розчин, оскільки є універсальним джерелом вуглецю який споживається практично всіма мікроорганізмами, тому для унеможливлення контамінації пропонуємо приготувати такий висококонцентрований розчин. В статті [26] зазначено, що для культивування даного біологічного агенту використовується пептид колагену I типу (TC343-10G). Пептид колагену I типу є гідролізованою формою колагену, який є легкокорозчинним у воді та не утворює плівки на поверхні води. [66]

3. Композиція Б складається, як з кальцієвих так і фосфорних солей. Якщо звернути увагу на концентрацію солі CaCl_2 - 0,05 г/л, можна помітити що дана концентрація не є такою, що спричиняє утворення нерозчинного осаду при стерилізації разом з фосфорними солями. Відповідно немає потреби на цій та подальших стадіях готувати титрувальні агенти. [67]

4. Оскільки перша стадія вимагає приготування лише 1000 мл поживного середовища, скористаємося качалочними колбами з стандартним об'ємом 750 мл з коефіцієнтом заповнення 0,2 (знадобиться 7 колб). Даний об'єм без проблем можна стерилізувати з використанням автоклаву.

Табл. 5.6 демонструє дані щодо розрахункової маси компонентів і відповідного об'єму води, потрібних для приготування поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах з використанням качалок.

**Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу
Bacillus megaterium КМ 369985 в колбах на качалці**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 1000 мл середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, мл
Глюкоза	20	20	А	50
Пептид колагену I типу	10	10		
Вода		50 (мл)		
CaCl ₂	0,05	0,05	Б	950
NaH ₂ PO ₄	0,5	0,5		
K ₂ HPO ₄	0,5	0,5		
Вода		950 (мл)		
Усього				1000

Аналогічно до попереднього етапу, проводимо аналіз та формування композицій для вирощування бактерій *B. megaterium* КМ 369985 в інкуляторі об'ємом 15 л:

Композиція А: глюкоза, пептид колагену I типу (умови термічної обробки: температура складає 112°C - 115°C, тиск встановлено на 0,05 МПа, тривалість процесу 20-30 хвилин).

Композиція Б: CaCl₂, NaH₂PO₄, K₂HPO₄ (умови термічної обробки: температура складає - 131 °С, тиск встановлено на 0,15 МПа, тривалість процесу 40-60 хвилин).

Дані композиції були сформовані на основі нижче наведеної інформації:

1. Термолабільність компонентів. Глюкоза та пептид колагену I типу стерилізується окремо від солей (так само як і під час попереднього етапу). Стерилізацію будемо проводити з використанням автоклаву в колбі об'ємом 1 л, тому, що об'єм композиції невеликий та складає лише 450 мл, враховуючи добру розчинність сполук та необхідність приготування 40% розчину глюкози для запобігання мікробного забруднення.

2. Солі хлориду кальцію та фосфати дозволено стерилізувати разом, ґрунтуючись на інформації яка раніше була зазначена, що концентрація CaCl₂ недостатня, для утворення нерозчинного осаду. Варто зазначити що на даному етапі використовують незначні наважки солей (а саме CaCl₂ - 0,45 г; NaH₂PO₄ - 4,5 г; K₂HPO₄

– 4,5 г), тому доцільніше буде приготувати концентрат солей (1 л), проте беремо колбу об'ємом 2 л, компоненти розчиняємо звичайним переміщенням, а наступний етап – подача цього концентрату до простерилізованого інокулятора з допомогою конектору для асептичної передачі розчинів, додаємо воду для отримання композиції необхідного об'єму та здійснюємо стерилізацію при зазначених умовах. [67]

Табл. 5.7 демонструє дані щодо розрахункової маси компонентів і відповідного об'єму води, потрібних для приготування 9 л поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 0,015 м³.

Таблиця 5.7

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу

***Bacillus megaterium* КМ 369985 в інокуляторі об'ємом 0,015 м³**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 9 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	20	180	А	0,45
Пептид колагену I типу	10	90		
Вода		0,45 (л)		
CaCl ₂	0,05	0,45	Б	8,55
NaH ₂ PO ₄	0,5	4,5		
K ₂ HPO ₄	0,5	4,5		
Вода		7,7 (л)		
Конденсат		0,85 (л)		
Усього				9

Аналогічно до попереднього етапу, проводимо аналіз та формування композицій, проте наразі це для виробничого культивування бактерій *B. megaterium* КМ 369985 у біореакторі 150 л:

Композиція А: глюкоза, пептид колагену I типу (умови термічної обробки: температура складає 112°C - 115°C, тиск встановлено на 0,05 МПа, тривалість процесу 20-30 хвилин).

Композиція Б: CaCl₂, NaH₂PO₄, K₂HPO₄ (умови термічної обробки: температура складає - 131 °С, тиск встановлено на 0,15 МПа, тривалість процесу 40-60 хвилин).

Дані композиції були сформовані на основі нижче наведеної інформації:

1. Композицію А, об'ємом 4,05 л будемо готувати в реакторі – змішувачі - 10 л, де власне і передбачається стерилізація даної композиції з допомогою гострої та

глухої пари, що подаються в середину апарату та в сорочку відповідно. Дана композиція приготовлена таким чином, аби була максимальна концентрація компонентів.

2. До композиції Б, яка містить солі у кількості (CaCl_2 – 4,05 г; NaH_2PO_4 – 40,5 г; K_2HPO_4 – 40,5 г) яку доцільніше спочатку розчинити у бутлі - 5 л, наступна дія - подача даного концентрату до простерилізованого ферментеру з допомогою конектору для асептичної передачі розчинів, додаємо воду для отримання композиції необхідного об'єму. Також варто зауважити, що дана композиція містить солі хлориду кальцію та фосфати, але як зазначалось раніше концентрація CaCl_2 в композиції недостатня для утворення нерозчинного осаду. Тому можемо без перешкод та додаткових титрувальних агентів стерилізувати солі разом. [67]

Табл. 5.8 демонструє дані щодо розрахункової маси компонентів і відповідного об'єму води, потрібних для приготування 81 л поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом $0,15 \text{ м}^3$.

Таблиця 5.8

Композиції стерилізації компонентів для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом $0,15 \text{ м}^3$

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 81 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	20	1620	А	4,05
Пептид колагену I типу	10	810		
Вода		3,65 (л)		
Конденсат		0,4 (л)	Б	76,95
CaCl_2	0,05	4,05		
NaH_2PO_4	0,5	40,5		
K_2HPO_4	0,5	40,5		
Вода		69,25 (л)		
Конденсат		7,7 (л)		
Усього				81

У процесі ферментації, зумовленому інтенсивною аерацією та присутністю колагену в живильному середовищі, часто спостерігається значне піноутворення. Це явище становить потенційну загрозу мікробної контамінації, що потребує впровадження відповідних заходів з піногасіння. Одним із найбільш ефективних та

технологічно простих методів є механічне піногасіння шляхом встановлення мішалки у верхній частині ферментера, яка забезпечує руйнування піни без використання хімічних реагентів. Альтернативно можливе застосування хімічних антипінних агентів, серед яких використовуються як натуральні (зокрема жири), так і синтетичні сполуки. Жирова фракція, окрім антипінної дії, може слугувати додатковим джерелом енергії для мікроорганізмів. Проте продукти їхнього метаболізму — жирні кислоти — призводять до зниження рН середовища, що, своєю чергою, вимагає постійної корекції кислотно-лужного балансу із застосуванням буферних або титрувальних речовин. Отже, у межах даного дослідження використання хімічних піногасників визнано недоцільним. [48]

Підготовка титрувальних розчинів у рамках даного технологічного процесу не передбачається, попри наявність у складі композиції Б кальцієвих і фосфатних солей, які додаються при формуванні поживного середовища як в інокуляторі (15 л), так і у біореакторі (150 л). Така технологічна стратегія є виправданою з огляду на те, що концентрація хлориду кальцію в середовищі становить лише 0,05 г/л, що є суттєво нижчою за порогове значення (0,2 г/л), необхідне для ініціації утворення нерозчинного осаду. Отже, за даних умов ризик випадіння фосфатно-кальцієвого осаду відсутній. [67]

Розрахунок біомаси. У середовищі міститься 20 г/л глюкози. Припустимо, що тільки половина (тобто 10 г/л) використовується для побудови біомаси, а решта витрачається на енергетичні потреби клітин — наприклад, для дихання. Молекулярна маса глюкози — 180 г/моль, з яких 72 г припадає на вуглець. Отже, в 10 г глюкози має лише 4 г вуглецю. Оскільки біомаса містить приблизно 50% вуглецю, то з 4 г вуглецю може утворитися близько 8 г біомаси на літр середовища. Така кількість клітин характерна для основного етапу виробництва — коли мікроорганізми активно ростуть у великому об'ємі. Проте на першому етапі отримання інокуляту кількість біомаси зазвичай менша — близько 4 г/л. Це пов'язано з тим, що даний етап не передбачає головним чином отримати максимальний вихід клітин, через менші об'єми середовища, короткий час культивування або інші умови, які не сприяють максимальному накопиченню біомаси.

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ВИРОБНИЧОГО ОБЛАДНАННЯ

В табл. 6.1 продемонстровано специфікацію обладнання (експлуатаційні параметри), що задіяне у процесі виробничого біосинтезу ферменту колагенази. Схематичне зображення апаратного оформлення біосинтезу колагенази із застосуванням штаму *B. megaterium* КМ 369985 подано у графічних матеріалах.

Таблиця 6.1

Специфікація устаткування для ділянки допоміжних робіт та виробничого обладнання для біосинтезу ферменту колагенази

Позиція обладнання	Найменування обладнання	Кількість обладнання	Технічна характеристика обладнання (виробник)
1	2	3	4
ПЗ -1	Прилад для забору повітря	1	Шахта для забору повітря, приточна («Prolisok», Україна). Діаметр - 650 мм, загальна довжина – 100 см, товщина стінок – 30 мм. Матеріал – АБС-пластик, поліуретан. [68]
Ф-2	Фільтр грубого очищення	1	Фільтр серії ФЯП, фільтрувальний матеріал – пінополіуретан («Київський вентиляційний завод», Україна). Розміри (в×ш) – 514 мм, найвищий тиск – 60 Па, Е=50-85%, продуктивність – 1540 м ³ /год. [47]
К-3	Компресор	1	Компресор серії Т2 («Dalgakiran», Україна). Розміри, д ×ш ×в, мм: 2450 ×1640 ×1900, потужність роботи – 125 - 230 кВт, інтенсивність роботи– 1394 – 2250 м ³ /год, тиск варіюється в межах – 5,5 – 8,8 бар. [69]
Т-4	Теплообмінник - охолоджувач	1	Промисловий охолоджувач повітря серії JH157 («JHCOOL», Китай). Габарити, д ×ш ×в, мм:408×550×1665, потужність роботи –0,18 кВт, інтенсивність роботи – 3500 м ³ /год, вага 28 кг. [70]

НУХТ БТЕК 04.01.31 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ВИРОБНИЧОГО ОБЛАДНАННЯ	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.	Пархомова О.О.						76	141
Перевір.	Красінько В.О.					Кафедра БТМ		
Консультант								
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

Р-5	Ресивер	1	Ресивер серії РВ 900. 818.01 (« фірма ООО "ЗЕО Лидер", Україна). Розміри, д×ш×в, мм: 902×1002×2237, робочий об'єм – 900 л, тиск варіюється в межах – 10 бар (перевірочний тиск 13 бар), температурні межі -5-40 °С, матеріал корпусу – сталь. [71]
Т-6	Теплообмінник - нагрівач	1	Нагрівач стисненого повітря німецької фірми «CryoSnow». Розміри, д×ш×в, мм: 420×570×400, вага 27 кг, тиск варіюється в межах – 3-16 бар, інтенсивність роботи – 0,5 – 50 м ³ /хв, потужність роботи – 8500 Вт, температурні межі – 0-100°С. [72]
Ф -7	Фільтр головного очищення	1	Кишеньковий фільтр сурії ФВКОМ F9 (фірма «New Filter», Україна). Е=95%, фільтрувальний матеріал – мікроскловолокно, температурні межі 65-80°С, вологостійкість матеріалу – 90-100%. [49]
ІФ – 8, ІФ – 13	Індивідуальний фільтр	2	Повітряний фільтр Ultradepth серії П Р-SRF («Donaldson», США). Е=99,99998%, фільтрувальний матеріал – боросилікат, температурні межі -20°С до +200°С. [50]
І - 9	Інокулятор	1	Посівний апарат RCP-M15L об'ємом 15 л (компанія «Sartorius Stedim Biotech», Франція). Розміри, д ×ш ×в, мм: 750 ×1000 ×1900, тиск варіюється в межах – 0,05-0,2 МПа, вага – 215 кг, матеріал корпусу - нержавіюча сталь AISI 304, матеріал контакту з КР - нержавіюча сталь AISI 316L, наявна сорочку та барботер, потужність роботи двигуна – 0,8 кВт, оберти перемішувального пристрою – 20 - 1000 об/хв, є система моніторингу рН, рО ₂ , температури, піноутворення, є манометр. [64]
Д - 10 , Д - 12, Д - 15	Об'ємний дозатор для води	3	Дозатор холодної води серії ETR-C(H) 15/110 R50H/40V (фірма «Gross», Україна). Розміри, д ×ш ×в, мм: 110×66 ×67. Продуктивність – 1,6 м ³ /год, мінімальне значення витрати – 0,025 м ³ /год. [73]
Р - 11	Реактор змішувач для композиції А	1	Реактор серії СЕон 0,01 об'ємом 10 л (фірма «Єврохіммаш», Україна). Матеріал – емальована сталь. Розміри, д ×ш ×в, мм: 420 ×350 ×450, маса – не більше 120 кг, має лопатевий перемішувальний пристрій: w– 100 об/хв, потужність роботи двигуна – 0,75 кВт, має сорочку. [65]

ФР - 14	Ферментер	1	<p>Бioreактор серії BR500-M1 (фірма «LAB1ST», Шанхай). Розміри, д × ш × в, мм: 1000×928×1790. Матеріал – сталь SUS316L, має сорочку та барботер, є системи моніторингу: датчики рН, рО₂, температури, манометр та пробовідбірник, турбінна мішалка – 50-1000 об/хв. Стандартний тиск апарату – 0,3 МПа. [46]</p>
Н - 16	Відцентровий насос для перекачування КР від ферментеру до збірника КР	1	<p>Відцентровий насос серії BE-M 14 («Rover pompe», Італія). Розміри, д × ш × в, мм: 230 × 120 × 190. Заявлена продуктивність роботи – 0,9 м³/год (або 15 л/хв), потужність роботи - 0,45 кВт, матеріал корпусу – бронза. [74]</p>

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ФЕРМЕНТУ КОЛАГЕНАЗИ БАКТЕРІЯМИ *BACILLUS MEGATERIUM* КМ 369985

Виробничий процес біосинтезу цільового продукту — ферменту колагенази — включає низку різноманітних операцій, що забезпечують ефективне та оптимальне культивування мікроорганізму-продуцента. З метою кращого сприйняття та узагальнення інформації доцільно представити технологічну схему біосинтезу колагенази, яку продукує штам *B. megaterium* КМ 369985.

Наступний опис схеми технологічного процесу включає в себе опис допоміжних робіт (ДР), це перш за все підготовка повітря що подається в інокулятор та ферментер, оскільки продуцент – *B. megaterium* КМ 369985 є аеробом, готують відповідне поживне середовище, яке в даному випадку містить крім солей та глюкози ще й пептиду колагену I типу – білковий компонент, що виступає не тільки джерелом азоту, а й відіграє важливу функцію, є індуктором синтезу ферменту колагенази, підготовку, та опис стадій технологічного процесу (ТП), а саме підготовку посівного матеріалу в колбах, інокуляторі та власне виробничий біосинтез ферменту колагенази.

Графічна частина містить технологічну схему біосинтезу ферменту колагенази за участю бактерій *B. megaterium* КМ 369985.

ДР 1. Підготовка повітря для аерації

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

На даному етапі передбачається використання спеціалізованого обладнання для забору атмосферного повітря — повітрозабірника (ПЗ-1), конструктивно виконаного у вигляді вертикальної труби, оснащеної захисною решіткою. Ця решітка запобігає потраплянню великих механічних часток. Забір повітря здійснюється на висоті 10 метрів.

ДР 1.2. Очищення повітря на фільтрах грубого (попереднього) очищення

Атмосферне повітря, яке подається через повітрозабірник (ПЗ-1), надходить на

					НУХТ БТЕК 04.01.31 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Пархомова О.О.				РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ФЕРМЕНТУ КОЛАГЕНАЗИ БАКТЕРІЯМИ <i>BACILLUS MEGATERIUM</i> КМ 369985	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Красінько В.О.						79	141
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

стадію грубого очищення у фільтрах (Ф-2), де здійснюється видалення крупнодисперсних механічних домішок. У даному процесі застосовується фільтр типу ФЯП на основі пінополіуретану, продуктивність роботи якого становить 1540 м³/год. Ефективність затримання зважених частинок коливається в межах 50–85 %, а пилоємність фільтрувального матеріалу досягає 2000 г/м³. Завдяки цьому забезпечується видалення частинок розміром від 10 до 50 мкм [45,47].

ДР 1.3. Стиснення повітря

Після очищення повітря на фільтрах грубого очищення (Ф-2), воно надходить до компресору (К-3), де здійснюється стискання до 0,35—0,5 МПа. Крім того, стиснене повітря характеризується підвищеною температурою, 120—250 °С.

ДР 1.4. Охолодження стисненого повітря

Маючи температуру 120—250 °С повітря, для подальшого очищення необхідно його охолодити та видалити зайву вологу. Для цього встановлюється необхідне обладнання – теплообмінники промислового типу (Т-4) з допомогою якого повітря охолоджується до температури 25 - 40°С.

ДР 1.5. Стабілізація повітря у ресивері

Отримане охолоджене повітря (від ДР 1.4) проходить через ресивер (Р-5), де здійснюється видалення зайвої вологи (вологість повітря становить близько 50%), а також забезпечення отримання ламінарного потоку повітря для подальших стадій.

ДР 1.6. Нагрівання повітря

Ламінарне повітря (від ДР 1.5) далі проходить через нагрівач стисненого повітря (Т-6), з метою підігріву до температурних меж 70 - 90°С з участю пари низького тиску (Р – 0,2 МПа).

ДР 1.7. Очищення повітря у головному фільтрі

Підігріте та стабілізоване повітря (від ДР 1.6) подається у фільтри головного очищення (Ф-7) - кишенькові фільтри, в яких у якості фільтрувального матеріалу використовується мікроскловолокно. На даному етапі забезпечується 98% ступінь очищення повітря. Відбувається затримка частинок розміром 0,5 мкм і більше. [45,49]

ДР 1.8. Очищення повітря у індивідуальному фільтрі

Практично очищене повітря від фільтрів головного очищення (Ф-7) надходить до фільтрів індивідуального очищення (ІФ-8 та ІФ-13), які встановлюються перед посівним апаратом (І-9) та ферментером (ФР-14). Забезпечення максимального ступеня очищення здійснюється за участю індивідуальних фільтрів Ultradepth серії П Р-SRF, де в якості фільтрувального матеріалу використовується боросилікат, що має ефективність очищення 99,99998% відносно частинок розміром 0,01 мкм. [50]

ДР 2. Приготування і стерилізація поживних середовищ

ДР 2.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках

Перший етап передбачає культивування в колбах на лабораторних качалках (обертючих струшувачах). Для цього необхідно приготувати 1000 мл поживного середовища, попередньо здійснивши розрахунок необхідної кількості компонентів і об'єму води, що забезпечить правильне відтворення заданих композицій (табл. 5.6).

ДР 2.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

Зважуємо 20 г глюкози та 10 г пептиду колагену І типу (на технічних терезах). В колбу об'ємом 100 мл поміщаємо наважки, додаємо 50 мл питної води, що відміряна мірним циліндром об'ємом 100 мл, та ретельно перемішуємо, закриваємо колбу ватно-марлевою пробкою та проводимо стерилізацію з використанням автоклаву при наступних умовах: температурний режим - 112°C, тиск - 0,05 МПа, тривалість процесу - 30 хв.

ДР 2.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б

Зважуємо 0,05 г CaCl_2 , 0,5 г NaH_2PO_4 , 0,5 г K_2HPO_4 (на технічних терезах) та переносимо наважку в термостійку колбу об'ємом 2 л. Додаємо 950 мл дистильованої води мірним циліндром на 1 л, та ретельно перемішуємо до розчинення всіх солей, закриваємо ватно – марлевою пробкою та проводимо стерилізацію в автоклаві при наступних умовах: температурний режим - 131 °С, тиск - 0,15 МПа, тривалість процесу 40 хв.

ДР 2.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 0,015 м³

Підготовка інокуляту в посівному апараті об'ємом 0,015 м³ передбачає приготування 9 л поживного середовища, де вміст компонентів та необхідний об'єм води що забезпечить правильне відтворення заданих композицій наведено в *табл. 5.7.*

ДР 2.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

Зважуємо 180 г глюкози та 90 г пептиду колагену І типу (на технічних терезах). Наважки переносимо в термостійку колбу об'ємом 1 л та додаємо 450 мл питної води, використовуючи мірний циліндр об'ємом 500 мл, ретельно перемішуємо розчин до розчинення всіх компонентів та проводимо стерилізацію в автоклаві при наступних умовах: температурний режим - 112°C, тиск - 0,05 МПа, тривалість процесу - 30 хв.

ДР 2.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

Зважуємо 0,45 г CaCl₂, 4,5 г NaH₂PO₄ та 4,5 г K₂HPO₄ (на технічних терезах). Оскільки наважки солей незначні, приготуємо концентрат об'ємом 1 л. Тобто переміщаємо наважки в колбу об'ємом 2 л та з допомогою мірного циліндру об'ємом 1 л додаємо 1000 мл питної води, та перемішуємо до розчинення всіх солей. З допомогою конектору для асептичної передачі розчинів переносимо цей концентрат до простерилізованого інокулятора (І-9) об'ємом 15 л. Далі, використовуючи дозатор (Д-10) в інокулятор (І-9) подається вода що залишилась, в кількості 7,7 л (та враховуємо 0,85 л конденсату, що утворюється при стерилізації). Стерилізувати будемо безпосередньо в інокуляторі (І-9) при наступних умовах: температурний режим - 131 °С, тиск - 0,15 МПа, тривалість процесу 40 хв, з допомогою гострої та глухої пари, що подаються в середину апарату та в сорочку відповідно. Охолодження композицій до відповідної температури культивування здійснюється подачею охолодженої (оборотної) води, що спрямована до сорочки посівного апарату.

ДР 2.3 Приготування і стерилізація ПС для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 0,15 м³

Виробничий біосинтез ферменту колагенази в ферментері об'ємом 0,15 м³ передбачає приготування 81 л поживного середовища. Складові компоненти які

необхідні для приготування поживного середовища та відповідний об'єм води що забезпечить правильне відтворення заданих композицій наведено в *табл. 5.8*.

ДР 2.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

Зважуємо 1620 г глюкози та 810 г пептиду колагену І типу (на технічних вагах). Переносимо наважки в реактор – змішувач (Р-11) об'ємом 10 л, та додаємо 3,65 л питної води, з допомогою дозатору (Д-12). Обов'язково враховуємо 10% (400 мл) конденсату який буде утворюватись при стерилізації. Вмикаємо перемішувальний пристрій (150 об/хв) – необхідне розчинення складових. Стерилізуємо безпосередньо в реакторі (Р-11) при наступних умовах: температурний режим - 112°C, тиск - 0,05 МПа, тривалість процесу - 30 хв, з допомогою гострої та глухої пари, що подаються в середину апарату та в сорочку відповідно. Охолодження композицій до відповідної температури культивування здійснюється подачею охолодженої (оборотної) води, що спрямована до сорочки реактора (Р-11).

ДР 2.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б

Зважуємо 4,05 г CaCl_2 , 40,5 г NaH_2PO_4 та 40,5 г K_2HPO_4 (на технічних вагах). Оскільки наважки мають невелику масу, спочатку розчинимо солі в бутлі -5 л. Власне, переносимо солі в бутель об'ємом 5 л та додаємо 3000 мл води, використовуючи колбу об'ємом 5 л. Після розчинення перетискаємо розчин у завчасно простерилізований біореактор (ФР-14) об'ємом 0,15 м³ з допомогою конектору для асептичної передачі розчинів. Далі, в ферментер (ФР-14) подається вода що залишилась, в кількості 69,25 л з допомогою дозатору (Д -15), враховуємо 7,7 л конденсату, що утворюється при стерилізації. Стерилізувати будемо безпосередньо в ферментері (ФР-14) при наступних умовах: температурний режим - 131 °С, тиск - 0,15 МПа, тривалість процесу 40 хв, з допомогою гострої та глухої пари, що подаються в середину апарату та в сорочку відповідно. Охолодження композицій до відповідної температури культивування здійснюється подачею охолодженої (оборотної) води, що спрямована до сорочки біореактора (ФР-14).

ТП 3. Підготовка посівного матеріалу

ТП 3.1. Підтримання колекційної культури *V. megaterium* КМ 369985

Бактерії *V. megaterium* КМ 369985, як колекційну культуру зберігають на середовищі LB (Лурія–Бертані). Дане поживне середовище використовують також для подальшого вирощування бактерій з метою отримання посівного матеріалу, який надалі є вихідним для культивування бактерії в колбах обертових струшувачах. [75]

Отже культуру зберігають в пробірках на скошеному агаризованому поживному середовищі (а саме Лурія–Бертані) при 2-4°C в темряві (в холодильнику). Оскільки *V. megaterium* КМ 369985 це спороутворювальні бактерії пересіви здійснюють раз у 2-3 місяці. Часто пересівати культуру не рекомендується, щоб запобігти зміні властивостей культури. Даний метод зберігання колекційної культури простий та зручний, крім того можна візуально спостерігати за морфолого-культуральними особливостями продуценту. Під час роботи з колекційною культурою необхідно забезпечити асептичні умови, для того щоб уникнути контамінації. Проте, обов'язковою умовою є проведення мікробіологічного контролю, який дає можливість підтвердити відсутність сторонньої мікрофлори. [44]

ТП 3.2. Отримання робочої культури *V. megaterium* КМ 369985 на агаризованому середовищі

Для отримання робочої культури потрібно скористатись чашками Петрі, в які попередньо розливають розплавлене (45°C - 50°C) поживне середовище Лурія–Бертані. Після охолодження та застигання агару, з допомогою бактеріологічної петлі, в асептичних умовах, здійснюють пересів з пробірок зі скошеним агаризованим середовищем (від попереднього етапу) на чашки Петрі методом виснаженого штриха. Чашки Петрі поміщають у термостат та інкубують при температурному режимі 37±1°C протягом 48-56 годин до отримання ізольованих колоній. [44,75]

ТП 3.3. Вирощування робочої культури *V. megaterium* КМ 369985 на агаризованих поживних середовищах

Отримавши ізольованих колоній на чашках Петрі (від ТП 3.2.), в асептичних умовах здійснюють пересів у пробірки зі скошеним агаризованим середовищем Лурія–Бертані, з допомогою бактеріологічної петлі. Важливо зазначити що 1

ізолювана колонія використовується для засіву лише 1 пробірки. Пробірки також поміщаємо у термостат та інкубуємо при температурному режимі $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ протягом 48-56 годин. На даному етапі проводять мікробіологічний контроль (висів культури на чашки Петрі та подальше мікроскопіювання) та контроль активності культури.

ТП 3.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

Спочатку приготуємо поживне середовище. Для цього в колбу (2 л), в якій було простерилізовано композицію Б (від ДР 2.1.2.) вносимо простерилізовану композицію А (від ДР 2.1.1.) в асептичних умовах та перемішуємо. Отримаємо 1000 мл поживного середовища яке розливаємо (по 150 мл середовища) в 7 качалочних колб об'ємом 750 мл.

Далі готуємо суспензію клітин для засіву. Для цього по 5 мл стерильного фізіологічного розчину (0,9% розчин NaCl) вносимо в пробірки з робочою культурою на скошеному агаризованому середовищі Лурія–Бертані (від ТП 3.3.). Таким чином, в асептичних умовах здійснюється змив клітин з поверхні агару та з допомогою піпетки переносимо по 5 мл суспензії в 7 колб з розлитим поживним середовищем. Варто зазначити що 1 колбу засівають культурою, яка була вирощена в одній пробірці. Засіяні колби ставлять на качалки (180 об/хв) та культивують при температурному режимі $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ протягом 72 годин.

Кожні 8 год відбираються проби культуральної рідини, в яких аналізують наявність чи відсутність сторонніх мікроорганізмів шляхом висіву на чашки Петрі з подальшим мікроскопіюванням колоній що вирости, крім того визначають концентрацію біомаси, яка має становити в середньому 4 г/л.

ТП 3.5. Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 0,015 м³

На даному етапі в інокуляторі (І-9) об'ємом 0,015 м³, знаходиться приготовлена та простерилізована композиція Б (від ДР 2.2.2.), в асептичних умовах, з допомогою конектору, потрібно також внести композицію А (від ДР 2.2.1.), що була простерилізована в автоклаві. Також необхідно підтримувати температуру на рівні $37\pm 1^{\circ}\text{C}$. Після того як в інокуляторі (І-9) змішали всі композиції, через засівний пристрій, в асептичних умовах, вноситься посівний матеріал (від ТП 3.4.). Оскільки мікроорганізми є аеробами через барботер подається стерильне стиснене повітря, а з

допомогою перемішувального пристрою відбувається циркуляція поживного середовища та диспергування бульбашок повітря (концентрація розчиненого кисню $pO_2 = 20-30 \%$ від насичення повітрям, інтенсивність подачі повітря 1л/л·хв). Значення рН має становити 7,0 - 7,5 (фіксується датчиками). Культивування проходить протягом 36 годин. Контролюємо всі параметри процесу з допомогою спеціальних датчиків та аналізаторів, що вимірюють температуру, рівень розчиненого кисню, піноутворення, тиск та ін. Кожні 8 год з інокулятора (І-9) відбираються проби культуральної рідини, в яких аналізують наявність чи відсутність сторонніх мікроорганізмів шляхом висіву на чашки Петрі з подальшим мікроскопіюванням, крім цього передбачається здійснення технічного контролю, визначається активність культури *B. megaterium* КМ 369985, контролюється її здатність до синтезу ферменту колагенази а також визначають концентрацію біомаси, яка повинна становити в середньому 4 г/л.

ТП 4. Виробниче культивування

ТП 4.1. Виробниче культивування з використанням ферментеру об'ємом 0,15 м³

Отримавши необхідну кількість поживного середовища, посівного матеріалу в та виконавши всі інші допоміжних робіт здійснюють виробниче культивування. Даний етап передбачає також попередню стерилізацію ферментеру гострою та глухою парою при температурі 126°C – 132°C, тиску 0,18 – 0,20 МПа протягом 1 години.

В простерилізованому біореакторі (ФР-14) попередньо проводили стерилізацію композиції Б (від ДР 2.3.2.), потім самоплином подають композицію А (від ДР 2.3.1.), яка була приготовлена та простерилізована в реакторі – змішувачі (Р-11). Після цього з інокулятора (І-9) об'ємом 0,015 м³ перекачують готовий посівний матеріал, через трубу перетискування, у ферментер (ФР-14) (від ТП 3.5.). Культивування здійснюють при температурі 37±1°C, яка підтримується внаслідок надходження пари в сорочку біореактора, $pO_2 = 20 - 30 \%$ (розчинений кисень) та інтенсивністю подачі повітря 1л/л·хв, рН 7,0 – 7,5, з постійним перемішуванням, протягом 72 годин. Після процесу

ферментації отримання культуральна рідина насосом (Н-16) перекачується до збірника культуральної рідини.

Параметри процесу легко контролюються, оскільки ферментер (ФР-14) обладнаний спеціальними датчиками та аналізаторами, що вимірюють температуру, рівень розчиненого кисню, піноутворення, тиск, рН та ін. Кожні 8 годин з ферментера (ФР-14) відбираються проби культуральної рідини для аналізу на наявність чи відсутність сторонніх мікроорганізмів шляхом висіву на чашки Петрі з подальшим мікроскопіюванням. Окрім цього, здійснюється технічний контроль. Процес культивування припиняють в тому випадку коли активність ферменту колагенази досягає максимального значення, тобто 600 Од/мл а концентрація біомаси в середньому складає 8 г/л.

РОЗДІЛ 8. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ФЕРМЕНТУ КОЛАГЕНАЗИ

Отримання культуральної рідини не є завершальним етапом біотехнологічного процесу, оскільки для подальшого застосування метаболітів необхідне їх виділення та очищення до відповідного рівня чистоти. Кількість стадій очищення залежить від метаболічної класифікації продукту (екзо- чи ендометаболіт), галузі застосування (аграрна, харчова, фармацевтична промисловість) та фізико-хімічних властивостей цільової сполуки.

Колагеназа, що продукується штамом *B. megaterium* КМ 369985, належить до екзометаболітів і передбачається для застосування в рамках ін'єкційної терапії рубцевих утворень. З огляду на фармацевтичне призначення препарату, необхідно досягти високого ступеня очищення, а саме Г25х. [76]

8.1. Отримання супернатанту методом центрифугування

Серед основних методів відокремлення біомаси від культурального середовища в біотехнологічній практиці найчастіше застосовуються фільтрація, центрифугування та флоціяція. Вибір конкретного підходу зумовлюється техніко-економічними критеріями та особливостями подальшої обробки. Для виділення ферменту колагенази доцільним є використання центрифугування, яке забезпечує ефективно та стабільно розділення без зниження продуктивності, властивого фільтраційним системам, де ефективність зменшується через забруднення фільтрувальних поверхонь. Центрифуги вирізняються простотою конструкції, можливістю автоматизації, відсутністю необхідності у додаткових реагентах або попередній підготовці середовища (коагуляція, добавки типу діатоміту для запобігання закупорюванню фільтрувальних поверхонь), що знижує експлуатаційні витрати. Висока ефективність центрифугування особливо характерна для клітин *B. megaterium* КМ 369985 (4×1,5 мкм), які схильні до агрегації. Таким чином центрифугування забезпечує високу ефективність осадження що значно перевершує

					НУХТ БТЕК 04.01.31 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Пархомова О.О.			РОЗДІЛ 8. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ФЕРМЕНТУ КОЛАГЕНАЗИ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Красінько В.О.					88	141
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

ефективність флотаційного підходу, який базується на барботажі повітря через культуральну рідину з утворенням піни та захопленням біомаси. Єдиним обмеженням методу є потенційне механічне ушкодження клітин під дією високих відцентрових сил, однак у нашому випадку воно не суттєве, оскільки біомаса не підлягає повторному використанню. [77]

Найчастіше у промисловості застосовуються осаджувальні центрифуги. Зокрема, модель ОГШ-202К-03 із горизонтальним ротором та шнековим механізмом автоматичного вивантаження осаду дозволяє проводити ефективне розділення при 4000 об/хв упродовж 10 хв при температурі 4°C. Її основні характеристики: кутова швидкість обертання – до 6000 об/хв, фактор розділення – 4000, потужність роботи двигуна – 5,5 кВт. Таким чином, метод центрифугування забезпечує отримання супернатанту з колагенолітичною активністю. [26,78]

8.2. Концентрування та очищення супернатанту ультрафільтрацією

Після центрифугування отриманий супернатант разом із цільовим ферментом має й інші баластні розчинені білки а також деякі залишки компонентів поживного середовища. Найбільш доцільним, наступним етапом є ультрафільтрація, яка поєднує концентрування білків і відділення присутніх низькомолекулярних речовин. Мембрани з порами 1–100 нм затримують макромолекули (зокрема ферменти), пропускаючи низькомолекулярні домішки, на відміну від мікрофільтрації з більшим діаметром пор (0,1–100 мкм). [77]

До переваг ультрафільтрації належать м'які умови проведення (низька температура, відсутність агресивних реагентів), що забезпечує збереження ферментативної активності. Окрім цього, обладнання є компактним, енергоефективним і конструктивно простим. Хоча швидкість процесу невисока, вона може бути підвищена шляхом застосування крос-флоу режиму, при якому потік рідини проходить вздовж поверхні мембрани та забезпечує стабільний потік і підвищену продуктивність. [77]

Альтернативи, як-от діаліз і електродіаліз, мають обмеження: зокрема, останній може вилучати важливі іони металів, зокрема Zn^{2+} , який є кофактором колагенази.

Його втрата через електричне поле може спричинити деактивацію ферменту, що обмежує застосування електродіалізу для очищення металозалежних білків. [76]

В патенті [79] пропонується використовувати метод тангенціальної ультрафільтрації (як було вище сказано крос-флоу режим) при якому супернатант подається паралельно до поверхні мембрани, а не перпендикулярно, як у традиційній фільтрації. Такий потік запобігає закупоренню мембрани й дозволяє ефективно концентрувати та очищувати супернатант. Установа для ультрафільтрації складається з 6 касет з Molecular Weight Cut-Off 10 кДа. Тобто ультрафільтраційна мембрана (поліетерсульфон) має порогове значення 10 кДа (маса молекули). Це означає, що мембрана буде ефективно затримувати молекули, маса яких становить 10 кДа або більше, і пропускати молекули з молекулярною масою значно меншою за 10 кДа. Площа фільтрації однієї касети 0,5 м² (для 6 касет 3 м²). В патенті також зазначено, що даний етап супроводжується заміною культуральної рідини на буферний розчин 25 мМ TRIS, 10 мМ CaCl₂, рН 7,1. Проте даний буфер економічно не вигідно використовувати в промисловості, тому пропонуємо обрати альтернативний фосфатний буферний розчин Na₂HPO₄/KH₂PO₄ із значенням рН 7.3 ± 0.1. [80]. Цей буфер може забезпечити стабільність ферменту, підтримувати його активність та бути сумісним з наступними методами очищення, такими як хроматографія. Процес заміни буфера відбувається шляхом багаторазового додавання свіжого буфера до концентрату (розчину, що затримується мембраною) при одночасному видаленні пермеату (розчину, що проходить крізь мембрану). Таким чином ми отримуємо сконцентрований у 15-25 разів розчин ферменту, що був очищений від низькомолекулярних речовин.

8.3. Слабка аніонообмінна хроматографія

Для отримання високоочищених препаратів ферментативної природи хроматографічні методи є одними з найбільш ефективних інструментів. Серед них найбільше застосування отримали такі типи хроматографії, як іонообмінна, гідрофобна, розмірно-ексклюзійна та афінна. Проте з урахуванням фізико-хімічних характеристик колагенази, доцільним є використання саме іонообмінної

хроматографії перед остаточним очищенням та концентруванням ферменту за рахунок використання ультрафільтраційної установки. [77]

Іонообмінна хроматографія ґрунтується на електростатичній взаємодії між зарядженими молекулами аналізованої суміші та функціональними групами, іммобілізованими на поверхні нерухокої фази. В якості нерухокої фази найчастіше використовується сорбент на основі діетиламіноетилену целюлози (DEAE – целюлоза). Колагеназа, як білок, що має ізоелектричну точку нижчу за значення рН (зазвичай $pI \approx 5.5-6.2$), при нейтральному рН набуває сумарного негативного заряду. Таким чином, для її ефективної сорбції застосовується аніонообмінна хроматографія, де нерухома фаза має позитивно заряджені групи, що дозволяє селективно зв'язувати колагеназу, залишаючи інші білки з меншою аніонною здатністю у фільтраті. [77]

В патенті [79] описано використання слабкої аніонообмінної хроматографії з смолою DE-52 (діетиламіноетилцелюлоза) для відокремлення колагенази від білків що не зв'язалися або мають інший ступінь зв'язування, а також усунення солей та інших низькомолекулярних сполук, які могли бути не повністю видалені на етапі ультрафільтрації. Для цього використовують хроматографічну колонку Pall Resolute Mod 400-V-EP7040, яка заповнюється смолою. Смола обов'язково врівноважують буфером 25 мМ $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 10 мМ KCl , із значенням рН 7.3 ± 0.1 . Цей етап потрібен для того, щоб смола досягла потрібного рН та іонної сили перед завантаженням зразка. Після цього на колонку подають концентрований розчин після ультрафільтрації. Промивають колонку фосфатним буфером. Цей етап потрібен для видалення білків, які не зв'язалися зі смолою під час завантаження. Далі здійснюється елюювання промивним буфером 300 мМ $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 10 мМ KCl , із значенням рН 7.3 ± 0.1 . Збільшення концентрації $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ у цьому буфері може сприяти видаленню деяких слабо зв'язаних молекул, але недостатньо для елюції цільової колагенази. Згодом зв'язану колагеназу елюють за допомогою елюційного буфера 300 мМ $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 700 мМ NaCl , 10 мМ KCl , із значенням рН 7.3 ± 0.1 . Висока концентрація NaCl (700 мМ) збільшує іонну силу буфера. Іони хлору (Cl^-) конкурують з негативно зарядженими білками за зв'язування з позитивно зарядженими групами DEAE на смолі. Збільшення концентрації солі призводить до руйнування

електростатичних взаємодій між колагеназою та смолою, що спричиняє її елюцію з колонки.

8.4. Концентрування та очищення розчину колагенази ультрафільтрацією

Наступним етапом після хроматографії, що описується в патенті [79] є ультрафільтрація, яка дозволяє сконцентрувати розчин ферменту у 3-6 разів та замінити елюційний буфер на буфер що більше підходить для наступного етапу хроматографічного очищення ферменту. Для цього пропонується використовувати ультрафільтраційну систему Cogent™ (Millipore) що складається з двох касет з Molecular Weight Cut-Off 30 кДа. Кожна касета має площу фільтрації 0,1 м², отже загальна площа фільтрації становить 0,2 м². У якості фільтрувальної мембрани використовують поліетерсульфон (PES) з низькою спорідненістю до білків для мінімізації втрат колагенази, тобто фермент не налипає на мембрану. Одночасно з концентруванням або після досягнення потрібної концентрації до концентрату починають додавати буфер (25 мМ Na₂HPO₄/KH₂PO₄, 10 мМ KCl, pH 7.3 ± 0.1) з певною швидкістю, одночасно підтримуючи постійний об'єм концентрату або продовжуючи концентрування з додаванням буфера. Це дозволяє вимивати залишки елюційного буфера (особливо високу концентрацію NaCl) та замінювати його на новий буфер.

8.5. Сильна аніонообмінна хроматографія

Для подальшого підвищення чистоти ферменту колагенази у патенті [79] описано використання сильної аніонообмінної хроматографії з використанням смоли Source™ 15Q (GE Healthcare) де в якості матриці використовується кульки полістирол/дивінілбензолу розміром 15 мкм з функціональною групою четвертинного аміну. Ця група є сильним аніонообмінником, що означає, що вона залишається позитивно зарядженою в широкому діапазоні pH (зазвичай від 2 до 12). Це забезпечує сильне зв'язування негативно заряджених молекул незалежно від невеликих змін pH у робочому діапазоні. Отже, на даному етапі використовується хроматографічна колонка Millipore GBP 70-550, яка заповнена смолою Source™ 15Q. Спочатку колонка промивається буфером 10 мМ Na₂HPO₄/KH₂PO₄, 10 мМ KCl при pH 7.3 ± 0.1. Це забезпечує потрібний pH та іонну силу смоли перед завантаженням зразка.

Сконцентрований розчин колагенази після ультрафільтрації подають на колонку де відбувається зв'язування негативно заряджених молекул колагенази з позитивно зарядженими четвертинними аміновими групами на смолі Source™ 15Q. Далі відбувається промивання колонки буфером для видалення білків, які не зв'язалися зі смолою або зв'язалися дуже слабо. Зв'язана колагеназа елюює шляхом збільшення іонної сили буфера. Замість використання NaCl, як у випадку зі слабкою аніонообмінною хроматографією, тут використовується збільшення концентрації Na₂HPO₄/KH₂PO₄ (до 300 мМ) в елюційному буфері (300 мМ Na₂HPO₄/KH₂PO₄, 10 мМ KCl при pH 7.3 ± 0.1). Збільшення концентрації іонів натрію (Na⁺), калію (K⁺), а також фосфат-іонів (HPO₄²⁻ та H₂PO₄⁻) призводить до ефективної конкуренції з негативно зарядженою колагеназою за зв'язувальні сайти на позитивно зарядженій смолі Source™ 15Q. Підвищена іонна сила елюційного буфера руйнує електростатичні взаємодії між колагеназою та смолою, що спричиняє її вивільнення та елюцію з колонки. Таким чином, на етапі сильної аніонообмінної хроматографії білки розділяються на основі їхнього заряду при pH 7.3 ± 0.1 та сили їхньої взаємодії з позитивно зарядженою смолою Source™ 15Q. Білки з позитивним або слабким негативним зарядом не зв'язуються і вимиваються першими, тоді як колагеназа, яка має достатній негативний заряд для зв'язування, елюює пізніше при зміні іонної сили буфера. Це дозволяє відокремити колагеназу від інших білків із різними зарядами.

8.6. Фінальне концентрування розчину колагенази методом ультрафільтрації

На завершальному етапі очистки розчин колагенази вже звільнений від супутніх білкових домішок. Водночас, унаслідок використання буфера з підвищеною іонною силою під час сильної аніонообмінної хроматографії, у зразку можуть залишатися значні кількості низькомолекулярних солей. Для їхнього усунення у патенті [79] передбачено проведення фінальної ультрафільтрації, яка дозволяє одночасно провести концентрацію ферменту та заміну буфера на низько іонний придатний для подальшого використання або стабільного зберігання ферментного препарату. Для цього пропонується використовувати ультрафільтраційну систему Cogent™ (Millipore) що складається з двох касет з Molecular Weight Cut-Off 30 кДа. Кожна

касета має площу фільтрації 0,1 м², тому загальна площа фільтрації становить 0,2 м². У якості фільтрувальної мембрани використовують поліетерсульфон (PES), що має низьку спорідненість до білків, тобто фермент не налипає на мембрану. Одночасно з концентруванням починають додавати фосфатний буфер (25 мМ Na₂HPO₄/KH₂PO₄, 10 мМ KCl, рН 7.3 ± 0.1). Таким чином ми отримуємо високо очищений ферментний розчин, що надходить на наступні етапи ліофілізації.

8.7. Сублімаційне сушіння ферменту колагенази

Ліофільне висушування ферменту колагенази є важливим етапом для збереження його біоактивності, подовження терміну придатності та забезпечення зручної форми для зберігання, транспортування і застосування. Цей метод дозволяє уникнути теплової денатурації, характерної для традиційних способів сушіння, оскільки реалізується при низьких температурах і зниженому тиску, що мінімізує теплове навантаження на білкову структуру. Окрім того, сублімаційна сушка є промислово доцільною технологією, що дозволяє одержувати стабільну субстанцію, яку пропонується використовувати як вихідну речовину для створення ін'єкційного препарату. [77]

Отриманий високоочищений ферментний препарат колагенази після ультрафільтрації, розливається у лотки для ліофілізації з метою подальшого ліофільного висушування. Процес ліофілізації включає три основні стадії:

1. Заморожування – лотки з розчином охолоджують до –40 °С з наступною витримкою протягом 2 годин.

2. Первинне сушіння – проводиться поступове підвищення температури зі швидкістю 0,5–1 °С/хв до цільового рівня, який має бути на 2 °С нижчим за критичну температуру розчину. Для білкових препаратів, зокрема колагенази в середовищі сахарози, критична температура зазвичай становить –30 °С, тому сушіння проводиться при –32 °С. Тиск у камері підтримують на рівні 16 Па (125 мТорр), що є оптимальним для ефективного сублімування льоду. Занадто низький тиск може знизити швидкість сублімації, тоді як занадто високий — призвести до небажаного танення льоду. Ця фаза триває орієнтовно 30 годин і забезпечує видалення основної частини вологи.

3. Вторинне сушіння – після завершення сублімації температуру повільно підвищують (на 0,1–0,2 °C/хв) до 40 °C з метою видалення залишкової зв'язаної води. Тривалість етапу становить 3–6 годин (оптимально – 4,5 год) до кінцевої вологості 0,5% мас. [81]

Після завершення сушіння висушений фермент надходить на етапи подрібнення, просіювання та фасування у пакети.

8.8. Подрібнення, просіювання та фасування субстанції

Ліофілізований фермент після висушування набуває форми пластин, які потребують подрібнення для подальшого дозування та фасування у споживчу тару. Для цього можуть застосовуватись різноманітні типи подрібнювального обладнання. При виборі конкретного способу подрібнення важливо враховувати бажаний ступінь диспергування продукту, а також теплоту, що виділяється під час процесу, оскільки підвищення температури може призвести до втрати каталітичної активності колагенази. [82]

Зазвичай фермент подрібнюють до стану тонкого помелу, де величина частинок складає від 0,05 мм до 1 мм. Проте також є такі види помелу як:

- Крупне – 25 мм – 250 мм
- Середнє – 5 мм – 25 мм
- Дрібне – 1 мм – 5 мм
- Надтонке (колоїдне) – до 10^{-4} мм [83]

Тонкодисперсний помел ліофілізованого ферменту може бути досягнутий шляхом використання кульових млинів, конструктивною особливістю яких є наявність подрібнювальних елементів — кульок різного діаметра. У різних секціях барабана співвідношення діаметрів кульок зазвичай становить 4:2:1, що забезпечує ефективне подрібнення матеріалу. Після завантаження сировини до барабана, останній приводиться в обертання, внаслідок чого кульки переміщуються під дією сили тяжіння. Процес подрібнення реалізується завдяки поєднанню ударного, розколювального та стирального механізмів дії. [82,83]

Оскільки процес подрібнення не забезпечує отримання частинок однорідного розміру, подальше фракціонування сировини шляхом просіювання є необхідним етапом. Враховуючи, що виробництво ферменту колагенази не є великотоннажним, обсяг отриманої сировини є відносно невеликим. Тому з економічної та технологічної точки зору доцільним є застосування лабораторних методів просіювання. У таких методах, як правило, використовуються сита з металевого дроту або синтетичних ниток (шовкових чи капронових) з розміром пор приблизно 0,1 мм. У результаті просіювання сировина розділяється на дві фракції: фракцію, що проходить крізь отвори сита (прохід), та фракцію, що затримується на його поверхні (схід), яка зазвичай підлягає повторному подрібненню. [84]

У зв'язку з невеликим обсягом виробництва, фасування ліофілізованого ферментного препарату планується здійснювати вручну у споживчу тару типу пакетів «Дой-Пак» із замком Zip-Lock, місткістю 0,1 кг (розміри 130 × 200 мм). З метою забезпечення стабільності та збереження ферментативної активності під час зберігання, пакувальні матеріали повинні забезпечувати надійний захист від дії світла та проникнення вологи. Для цього пропонується використовувати багатошарові пакети, виготовлені з комбінації поліетилентерефталат, алюмінієвої фольги та поліетилену. [85]

Схематичне зображення процесу післяферментаційного виділення та стабілізації колагенази, синтезованої штамом *B. megaterium* КМ 369985, наведено на *рис. 8.1.*

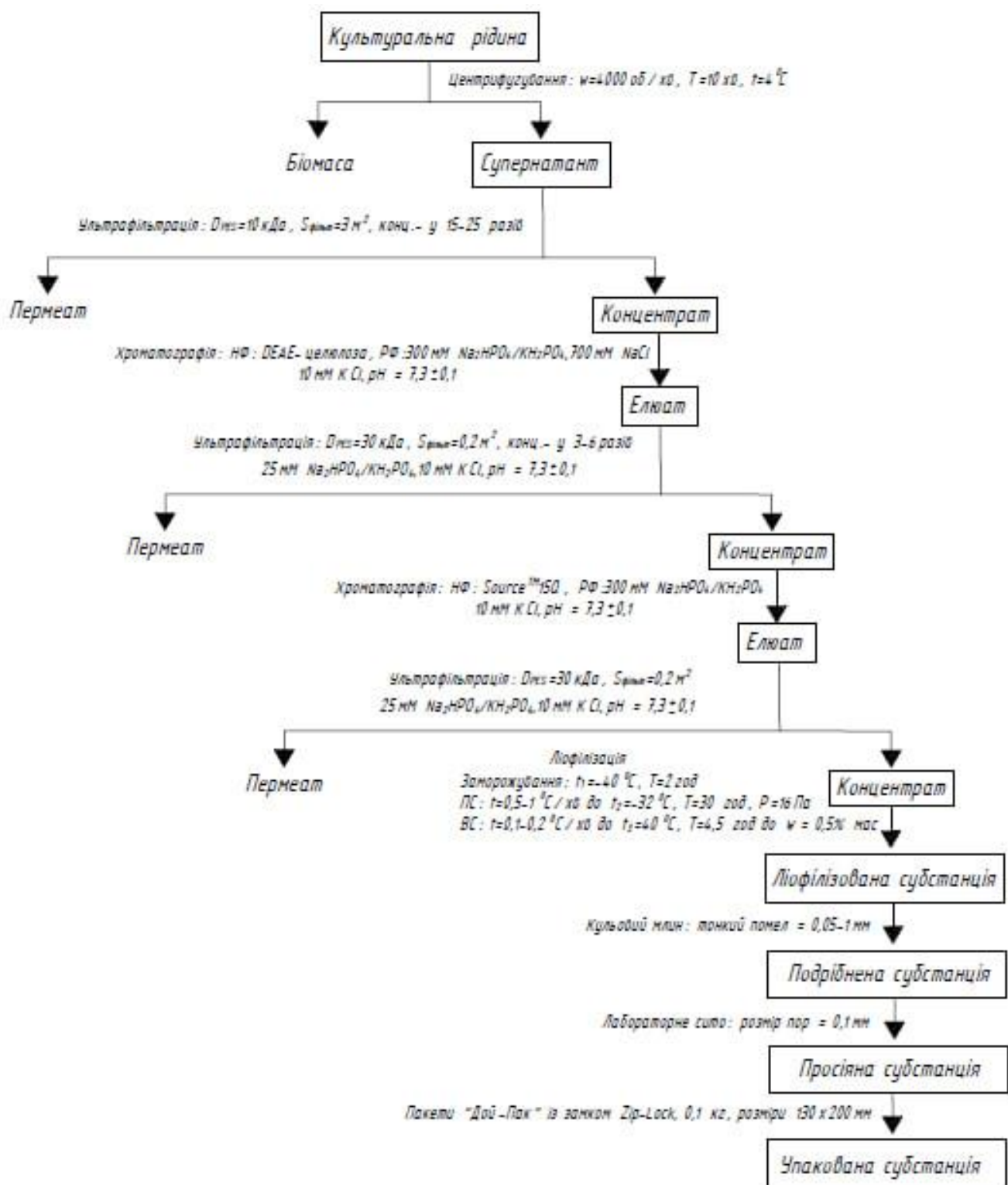


Рис. 8.1. Схема післяферментаційного виділення та очищення екзоферменту колагенази, синтезованого бактеріями *B. megaterium* KM 369985

РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ФЕРМЕНТУ КОЛАГЕНАЗИ БАКТЕРІЯМИ *BACILLUS MEGATERIUM* КМ 369985

Для забезпечення ефективного процесу культивування та отримання високоякісного цільового продукту — ферменту колагенази — на всіх етапах технологічного процесу впроваджується ретельний виробничий контроль. Зокрема, здійснюється визначення концентрації бактеріальної біомаси *B. megaterium* КМ 369985 ваговим методом, а також контроль основних поживних компонентів середовища — джерел вуглецю та азоту. У якості джерела вуглецю використовується глюкоза, вміст якої визначають глюкозооксидазним методом. Джерелом азоту слугує білковий компонент — пептид колагену І типу, концентрацію якого контролюють методом формольного титрування. Окрім того, проводиться аналіз концентрації та, що особливо важливо, ферментативної активності колагенази, синтезованої *B. megaterium* КМ 369985, за допомогою методу Azocoll. Не менш важливим є мікробіологічний контроль, який проводиться на всіх стадіях виробництва — під час підготовки поживного середовища, інокуляту та безпосередньо в процесі біосинтезу — з метою виявлення можливих контамінантів і забезпечення стерильності виробництва.

9.1. Мікробіологічний контроль поживного середовища та посівного матеріалу *B. megaterium* КМ 369985

Щоб уникнути негативного впливу сторонніх мікроорганізмів на процес біосинтезу та якість кінцевого продукту, у виробництві колагенази необхідно проводити систематичний мікробіологічний контроль. Його мета — переконатися в стерильності поживних середовищ і відсутності контамінації у посівному матеріалі. Навіть незначне мікробне забруднення може призвести до зниження активності продуцента, погіршення виходу ферменту та втрати бажаних технологічних характеристик.

Мікробіологічний контроль біотехнологічного виробництва передбачає:

					НУХТ БТЕК 04.01.31 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Пархомова О.О.			РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ФЕРМЕНТУ КОЛАГЕНАЗИ БАКТЕРІЯМИ <i>BACILLUS MEGATERIUM</i> КМ 369985	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Красінько В.О.					98	141
Консультант						<i>Кафедра БТМ</i>		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

1. Контроль стерильності середовищ, які будуть використані для культивування бактерій *B. megaterium* КМ 369985. На кожному технологічному етапі, включно з підготовкою поживного субстрату, інокуляцією та ферментацією, відбираються проби для аналізу. З інокулятора та ферментера проводиться відбір зразків із періодичністю 8 годин. Для виявлення можливих мікробних забруднень застосовуються спеціальні поживні середовища: сусло-агар (СА) використовується для ідентифікації грибкових форм та дріжджових клітин, а м'ясо-пептонний агар (МПА) — встановлення наявності бактеріальних форм.[44]

Аналіз починається з приготування поживного середовища безпосередньо в чашках Петрі. В асептичних умовах у попередньо стерилізовані ємності заливають 20–30 мл охолодженого до 45–50 °С агару. Після закриття кришками їх залишають на горизонтальній поверхні до повного застигання. Щоб переконатися у відсутності спонтанного зараження, чашки витримують 2–3 доби в термостаті при 30 °С. [44]

Після цього розпочинається посів: зразок об'ємом 30–50 мл беруть для аналізу, з нього 0,1 мл переносять у підготовлені чашки з агаром. Розподілення по поверхні середовища здійснюється стерильним шпателем Дригальського, який після занурення в спирт однократно обпалюють і охолоджують через дотик до внутрішньої частини кришки Петрі. Інкубацію посівів проводять за різними температурами: 30–32 °С для оцінки бактеріального фону, 24–26 °С — для встановлення грибкових забруднень. Через 6–8 годин здійснюється первинний огляд. За відсутності колоній на відповідних середовищах можна вважати, що поживне середовище відповідає вимогам стерильності. [44]

2. Аналіз чистоти інокуляту з метою виключення мікробного забруднення. Після підтвердження стерильності поживного середовища наступним кроком є оцінка мікробіологічної чистоти посівного матеріалу. Відсутність сторонньої мікрофлори у складі інокуляту особливо важлива для стабільності процесу культивування. Для цього застосовують два основні підходи:

- Класичне мікроскопічне дослідження з виготовленням фіксованих мазків;
- Індивідуальний посів на тверді поживні середовища методом «виснажувального штриха» для отримання ізольованих колоній. [86]

Посів здійснюють на стандартні діагностичні середовища. Так, для виявлення потенційних грибів або дріжджових клітин використовують СА, тоді як МПА дозволяє виявити бактеріальні домішки. Для додаткової ідентифікації культури *B. megaterium* КМ 369985, з якою працює виробництво, доцільно застосовувати селективні середовища: агар Мюллера–Хінтона та кров'яний агар (SBA), що містить овечу кров, які дозволяють точніше ідентифікувати морфологічні ознаки колоній, специфічні для даного штаму (рис. 2.2). Характерні ознаки росту колоній цього мікроорганізму наведено у табл. 9.1. [34,35]

Таблиця 9.1

Характеристика колоній *B. megaterium* КМ 369985 на різних поживних середовищах [34,35]

Назва поживного середовища	Опис колонії бактерій <i>B. megaterium</i> КМ 369985
Агар з овечою кров'ю	Колонії світло біолого кольору, іноді з сіруватим відтінком, колонії круглі, випуклої форми з рівними краями, гладенькі та глянцеві. Бактерії утворюють дрібні колонії, деякі можуть досягати середнього розміру.
Агар Мюллера-Хінтона	Колонії жовто-сірого кольору, мають круглу форму, колонії плоскі з рівними краями, глянцеві, середнього розміру.

Проведення мікроскопічного аналізу після отримання ізольованих колоній. Після отримання ізольованих колоній мікроорганізмів на твердому поживному середовищі переходять до мікроскопічного аналізу, що передбачає підготовку фіксованих препаратів.

Підготовка мазка:

1. Предметне скло має бути чистим і знежиреним (етанол або мильний розчин), що забезпечує рівномірний розподіл водної краплі.

2. Стерильну бактеріологічну петлю (попередньо фламбовану) занурюють у колонію та переносять матеріал у краплю води на склі.
3. Суспензію рівномірно розтирають на площі 2–4 см².
4. Сушать на повітрі або над полум'ям, уникаючи перегріву.
5. Для фіксації скло тричі проводять через полум'я пальника – це закріплює клітини та запобігає їх вимиванню при фарбуванні. [86]

Мікроскопіювання:

1. На готовий мазок наносять краплю імерсійного масла та розміщують препарат на столику мікроскопа.
2. Об'єктив ×90 опускають в імерсійне масло макрометричним гвинтом.
3. Дивлячись в окуляр, повільно підіймають об'єктив, поки не з'явиться зображення. Чіткість регулюють мікрометричним гвинтом для детального спостереження морфології клітин.
4. Отримане зображення аналізують на наявність чи відсутність забруднень сторонньою мікрофлорою та визначають морфологічні ознаки клітин мікроорганізму, які було розглянуто в пункті 2.2. «Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента *Bacillus megaterium* КМ 369985» [86]

9.2. Показники росту і синтезу ферменту колагенази

Даний підрозділ включає опис методик, що використовуються для кількісного визначення біомаси мікроорганізмів, концентрацій вуглецевих та азотистих компонентів поживного середовища, ферментативної активності колагенази, а також загального білкового вмісту в культуральній рідині.

9.2.1. Визначення концентрації біомаси *B. megaterium* КМ 369985

Для оцінки концентрації біомаси культури *B. megaterium* КМ 369985 застосовується ваговий спосіб – передбачає попереднє вилученні мікробної маси шляхом фільтрації з подальшим висушуванням до сталої маси в сушильному обладнанні. [44] Процедура аналізу виконується за наступною послідовністю:

1. Відібрати зразок культуральної рідини в об'ємі 25–30 мл для проведення вимірювання.

2. Провести фільтрацію відібраного зразка через попередньо зважені нітроцелюлозні фільтри з розміром пор 0,45 мкм, які встановлюють у воронки Бюхнера. Фільтри повинні бути доведені до постійної маси перед використанням.

3. Отримані фільтри з осадом біомаси поміщають у сушильну шафу та обробляють за температури 105 °С до досягнення сталої маси.

4. Після сушіння фільтри переміщують в ексікатор для охолодження до кімнатної температури в умовах зниженої вологості.

5. Заключним етапом є зважування охолоджених фільтрів разом із осадом на високоточних аналітичних вагах. [29,87]

Таким чином ми отримуємо певні значення, які використовуємо для визначення концентрації біомаси (г/л) з допомогою наступної формули:

$$X = \frac{(A - B) * 1000}{V}$$

де, X – кількість сухої біомаси, г/л; A – вага нітроцелюлозного фільтру з висušеним осадом, г; B – вага нітроцелюлозного фільтру без осаду, г; V – об'єм проби, який був взятий для аналізу, мл.

9.2.2. Визначення активності ферменту колагенази у культуральній рідині

Для визначення ферментативної активності колагенази на практиці застосовують найпоширеніший базовий метод Azocoll.

Принцип дії методу. Аналітична методика Azocoll ґрунтується на гідролітичній активності колагенази, яка розщеплює молекули колагену, попередньо міченого азобарвником (Azo). У процесі ферментативного розщеплення утворюються пептиди, які залишаються зв'язаними з барвником і переходять у розчин. Кількість утворених пофарбованих розчинних продуктів визначають шляхом спектрофотометричного аналізу при 520 нм – встановлена довжина хвиль, що дозволяє кількісно оцінити активність ферменту. [96]

У рамках цього методу використовується спектрофотометр UV-VIS (модель B582), що дозволяє проводити вимірювання оптичної щільності при визначеній довжині хвилі — 520 нм. Саме на цій довжині фіксується інтенсивність забарвлення, яке з'являється внаслідок дії ферменту колагенази на мічений барвником Azocoll

колаген. Спектрофотометричний аналіз дає змогу оцінити інтенсивність забарвлення зразка, що прямо пропорційно кількості утворених пептидів і, відповідно, ферментативної активності колагенази. Зміна показника світлопоглинання при 520 нм служить кількісним маркером активності ферменту в досліджуваному зразку. [96]

Перелік необхідних матеріалів та реактивів.

1. Azocoll – колаген що просочений азобарвником.
2. Буфер - 0,05 М трис-НCl, що містить 1 мМ CaCl₂ (рН 7,2) – допомагає стабілізувати середовище в якому проходить реакція, забезпечує оптимальні умови для роботи ферменту та забезпечує надійні та відтворювальні результати.
3. Безклітинний фільтрат – зразок культуральної рідини що містить фермент колагеназу, але не містить клітин мікроорганізму.
4. Лід – використовують для того щоб зупинити ферментативну реакцію розщеплення колагену. [96]

Умови проведення дослідю.

1. Готують Azocoll – колаген просочений азобарвником відмивається та суспендується в буфері 0,05 М трис-НCl (рН 7,2), що містить 1 мМ CaCl₂, до кінцевої концентрації 0,5%.
2. Реакція колагенази з Azocoll - безклітинний фільтрат (150 мкл) та буфер (150 мкл) змішують з суспензією Azocoll (270 мкл) в реакційній пробірці об'ємом 2 мл. Пробірки інкубують при 37°C на водяній бані, протягом 3 годин з перемішуванням.
3. Зупинка реакції - після 3 годин інкубації зразки охолоджують з допомогою льоду протягом 5 хв, для того щоб зупинити реакцію.
4. Зразки культуральної рідини центрифугують (10 000 об/хв) при температурі 4°C протягом 20 хв.
5. Вимірювання світлопоглинання – за допомогою спектрофотометра UV-VIS (модель B582) при 520 нм – встановлена довжина хвиль.
6. Розрахунок активності - одиницю активності ферменту (U) визначають як кількість ферменту на 1 мл досліджуваного зразка білку, яке призводить до

збільшення поглинання на 0,1 при 520 нм після 3 годин інкубації. Це свідчить про утворення розчинних пептидів, зв'язаних з азобарвниками.

7. Визначення питомої активності - питому активність розраховують як відношення ферментативної активності до загального вмісту білка в зразку і виражають в Од/мг. [96]

Обладнання для проведення аналізу.

Спектрофотометр Wensar Double Beam UV-VIS (рис. 9.1) є вискоефективним приладом, який призначений для вимірювання інтенсивності світла в спектральному діапазоні видимої та ультрафіолетової областей. Цей прилад використовують для наукових та промислових досліджень. [88]



Рис.9.1. Однопроменевий спектрофотометр Wensar Double Beam UV-VIS, LMSP-UV1000B [88]

9.2.3. Визначення загальної кількості білка у культуральній рідині

Крім визначення ферментативної активності колагенази, методом Azocoll, необхідно визначити загальну кількість білка у культуральній рідині – необхідна для розуміння питомої активності колагенази.

У більш загальному розумінні, питома активність ферментного препарату - це величина, що показує, яка частина всього білка в 1 мг ферментного препарату є активним ферментом. [89]

Для визначення загальної кількості білка пропонується використовувати відомий метод Бредфорда. Перевагами цього методу є: простота способу, не потребує великих об'ємів зразків, дорогих реагентів та складної апаратури, крім того, аналіз можна виконати протягом години з високою продуктивністю. [90]

Принцип дії методу. Власне цей метод передбачає властивість барвника кумасі діамантовий синій G-250 у кислому середовищі (створюваному за допомогою

фосфорної кислоти) взаємодіяти з білками. Основними мішенями для зв'язування барвника є амінокислотні залишки, такі як триптофан, гістидин, тирозин і фенілаланін. Окрім іонних взаємодій, стабільне з'єднання «білок-барвник» формується також за рахунок гідروفобних контактів, що покращує надійність та відтворюваність результатів. Після утворення комплексу барвник змінює свою структуру, набуваючи інтенсивного синього кольору. Оптичну щільність цього забарвлення вимірюють спектрофотометрично при 595 нм. Величина поглинання прямо залежить від концентрації білка у пробі, що дозволяє проводити точну кількісну оцінку вмісту білкових молекул у розчині. [90]

Перелік необхідних матеріалів та реактивів.

Для аналізу використовується наступне обладнання: пробірки 10 мл, колба об'ємом 1 л та 2 л, градуйований циліндр 100 мл, ваги для зважування, вортекс В-7М (рис. 9.2), спектрофотометр Wensar Double Beam UV-VIS (рис. 9.1).

Для аналізу використовують наступні реактиви:

1. В колбу об'ємом 1 л вносять 100 мг кумасі діамантового синього G – 250 та додають 50 мл 95% етанолу, розчиняють, відміряють та додають 100 мл 85% фосфорної кислоти і доводять об'єм до 600 мл дистильованою водою. Отриманий розчин фільтрують та переносять в колбу об'ємом 2 л та додають 100 мл гліцерину, після чого доводять дистильованою водою до об'єму 1 л.

2. Bovine Serum Albumin – BSA [91]

Умови проведення досліду. Перш за все треба підготувати стандартні розчини білка для отримання калібрувальної кривої:

1. Відміряємо необхідні об'єми стандартного розчину білка (наприклад, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 та 1,0 мл) в окремі пробірки.

2. Приготуємо пробірку – 1 мл дистилляту, служить холостою пробою для визначення фонового поглинання.

3. Додаємо по 5 мл реагенту Бредфорда в кожну пробірку (також в пробірку з дистильованою водою), перемішуємо з допомогою вортекса В-7М (рис. 9.2) для пробірок.

4. Інкубуємо протягом 10-30 хвилин. За цей час відбудеться взаємодія барвника з білками і утворюється характерне синє забарвлення.

5. Переносимо частину розчину з пробірок в окрему кювету. Вимірюємо світлопоглинання кожної проби на спектрофотометрі при 595 нм. Холоста проба використовується для встановлення нульової лінії.

6. Побудуємо графік залежності світлопоглинання (оптичної густини) від концентрації білка в стандартних розчинах. Зазвичай це лінійна залежність. [91]

Визначимо концентрацію білку в досліджуваному зразку:

1. Досліджуваним зразком є культуральна рідина (попередньо відділили біомасу центрифугуванням - 2500 об/хв протягом 10 хв). [92]

2. Відбираємо 0,2 мл зразку та переносимо в окрему пробірку на 10 мл, доводимо об'єм до 1 мл дистильованою водою.

3. Додаємо по 5 мл реагенту Бредфорда, перемішуємо з допомогою вортекса В-7М (рис. 9.2) для пробірок.

4. Інкубуємо протягом 10-30 хвилин.

5. Переносимо частину зразка з пробірки в окрему кювету. Вимірюємо світлопоглинання проби на спектрофотометрі при 595 нм.

6. За попередньо підготовленим калібрувальним графіком можемо визначити концентрацію білка в культуральній рідині. [91]



Рис.9.2. Лабораторний струшувач для пробірок Вортекс В-7М [93]

Отже, використовуючи метод Azocoll, для визначення ферментативної активності колагенази, та метод Бредфорда, для визначення загальної кількості білка, можна легко встановити питому активність ферментного препарату.

9.2.4. Визначення концентрації джерела вуглецю

Для культивування *B. megaterium* КМ 369985 глюкоза виступає джерелом вуглецевого живлення. Для визначення концентрації глюкози в культуральній рідині можна скористатись загальноживаним глюкозооксидазним методом.

Принцип дії методу. У цьому методі використовується фермент глюкозооксидаза, який запускає реакцію окиснення глюкози до глюконової кислоти, що супроводжується утворенням додаткового продукту — перекису водню (рис. 9.3).

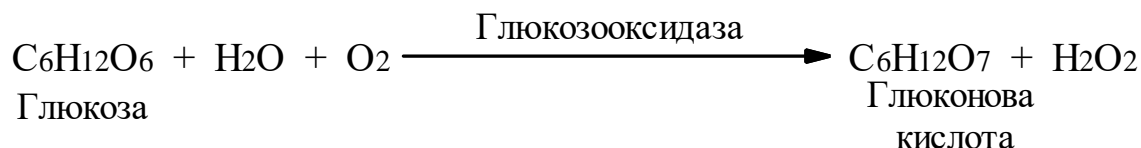


Рис. 9.3. Реакція окиснення глюкози за участю ферменту глюкозооксидази

Глюкозооксидаза — це фермент із групи флавопротеїнів, до складу якого входить кофермент ФАД (флавінаденіндинуклеотид). У процесі окиснення глюкози ФАД приймає два атоми водню, відновлюється до ФАДН₂ і передає ці атоми молекулі кисню, утворюючи при цьому перекис водню. [92] Утворений Н₂О₂ реагує з комплексом іонів міді Cu(II) у складі 2,2-біцинхонінатного комплексу, який має характерне зелене забарвлення. Перекис водню відновлює мідь до одновалентного стану Cu(I), в результаті чого утворюється фіолетовий комплекс Cu(I)-2,2-біцинхонінат. Насиченість забарвлення прямо залежить від кількості глюкози в досліджуваному зразку. Вимірювання інтенсивності цього кольору здійснюється за допомогою фотоелектроколориметра або спектрофотометра. [92,94]

Перелік необхідних матеріалів та реактивів.

Для проведення аналізу використовуємо наступні хімічні реактиви та матеріали:

1. Культуральна рідина – використовуємо як досліджуваний зразок для визначення концентрації джерела вуглецю (попередньо відділивши біомасу 2500 об/хв протягом 10 хв). [92]

2. Глюкозооксидаза - фермент, який каталізує окиснення глюкози до глюконової кислоти та перекису водню.

3. Біцинхонінова кислота (BCA) - сполука, яка утворює комплекс з іонами міді та використовується для приготування кольорового реагенту, який відновлюється під дією перекису водню.

4. Калію тартрат натрію (сегнетова сіль, $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) - використовується для підготовки кольорового реагенту.

5. Мідний купорос – іони міді утворюють комплекс з біцинхоніновою кислотою.

6. Етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА) – використовується для зупинки реакції утворення кольорового реагенту. [94]

Перелік необхідної апаратури:

1. Спектрофотометр Varian Techtron – для визначення оптичної густини проби.

2. Центрифуга MPW – 56 – для відокремлення біомаси з культуральної рідини. [49]

Умови проведення дослідю.

Для початку потрібно приготувати кольоровий реагент, що буде відновлюватись під дією перекису водню. Для цього необхідно виконати наступні дії:

1. Відміряти 10 мл 2% розчину калію тартрату натрію.
2. Відміряти 9 мл 4% розчину біцинхонінової кислоти.
3. Відміряти 1 мл 20мМ розчину мідного купоросу (сульфату міді).
4. Змішати компоненти до отримання однорідної суміші. [94]

Також потрібно підготувати калібрувальну криву, яка відображає залежність концентрації глюкози від оптичної густини розчину. За стандартною калібрувальною кривою будемо визначати концентрацію джерела вуглецю в культуральній рідині. Для цього потрібно виконати наступні дії:

1. Підготувати стандартні розчини глюкози з концентраціями 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 мкМ. Наприклад, для того щоб підготувати 20 мкМ розчину глюкози потрібно взяти 0,02 мл (20 мкл) 1М розчину глюкози та додати дистильованої води для отримання 1 мл кінцевого розчину. В разі необхідності можна збільшити об'єм кінцевого розчину для зручності.

2. До кожного з підготовлених розчинів глюкози додаємо 0,1 мл глюкозооксидази, та інкубуємо у термостаті: час - 30 хв, та 37°C.

3. Після закінчення терміну вносимо 2 мл кольорового реагенту до кожного зразка, та знову інкубуємо у термостаті: час - 30 хв, та 37°C.

4. Після інкубації додаємо 0,1 мл 0,2 М ЕДТА для завершення реакції.

5. Вимірюємо світлопоглинання кожного зразка при 562 нм за допомогою спектрофотометра.

6. Отримані значення оптичної густини використовуємо для побудови калібрувальної кривої, що характеризує залежність концентрації джерела вуглецю від оптичної густини. [94]

Для визначення концентрації джерела вуглецю необхідно здійснити попередню підготовку культуральної рідини для проведення аналізу. Тобто потрібно відділити біомасу шляхом центрифугування (2500 об/хв протягом 10 хв). [92,94] Використовуємо 1 мл безклітинної культуральної рідини та проводимо аналогічні дії, як і при визначенні оптичної густини для стандартних розчинів, а саме:

1. Інкубація з 0,1 мл глюкозооксидази у термостаті: час - 30 хв, та 37°C.

2. Додаємо 2 мл кольорового реагенту до проби та інкубуємо протягом 30 хв при температурі 37°C. Спостерігаємо зміну кольору Cu(II) 2-2'-біцинхонінатного комплексу з зеленого на фіолетовий.

3. Після інкубації додаємо 0,1 мл 0,2 М ЕДТА для завершення реакції.

4. Вимірюємо оптичну густину з допомогою спектрофотометра при 562 нм.

5. З допомогою калібрувального графіка визначаємо концентрацію джерела вуглецю в культуральній рідині. [94]

9.2.5. Визначення концентрації джерела азоту

У складі поживного середовища для вирощування *B. megaterium* КМ 369985 джерелом азоту є колаген I типу — білкова речовина, що складається з амінокислот. Враховуючи це, для аналізу азотного живлення визначатимемо вміст амінного азоту. Для цього обрано метод формольного титрування, який є простим у виконанні, не потребує складного обладнання чи дорогих реагентів і широко застосовується в лабораторній практиці. [95]

Принцип дії методу. Формальдегід, що входить до складу формольного розчину, реагує з вільними аміногрупами амінокислот, утворюючи N-метиленові похідні. У цьому процесі аміногрупа блокується, а карбоксильна група звільняється, що дозволяє її нейтралізувати за допомогою титрування розчином гідроксиду натрію. Об'єм лугу, витрачений на титрування, є прямим показником кількості амінного азоту в зразку. [95]

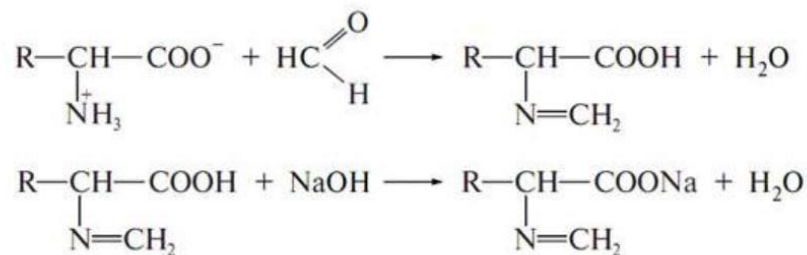


Рис. 9.4. Реакція формольного титрування [98]

Перелік необхідних матеріалів та реактивів. Для аналізу використовується наступне обладнання:

1. Дві колби об'ємом 200 мл та одна колба на 2 л
2. Бюретки для титрування

Для проведення аналізу використовуємо наступні хімічні реактиви та матеріали:

1. Культуральна рідина – використовуємо як досліджуваний зразок для визначення концентрації джерела азоту (попередньо відділивши біомасу 2500 об/хв протягом 10 хв). [92]

3. Спиртовий розчин фенолфталеїну (0,1%) – зважуємо 0,1 г фенолфталеїну та переносимо в колбу об'ємом 200 мл, додаємо 10 мл етанолу і до мітки – 100 мл додаємо дистильованої води.

4. Розчин NaOH (0,1 М) – наважку 4 г розчиняємо дистильованою водою в колбі об'ємом 2 л, після розчинення доливаємо дистиллятом до 1 л.

5. Нейтральний розчин формаліну (20%) [95]

Умови проведення дослідю.

1. Відбираємо 10 мл досліджуваного зразка (фільтрат культуральної рідини), переносимо в колбу об'ємом 200 мл та доливаємо дистильованої води до мітки 100 мл.

2. Додаємо декілька крапель 0,1% спиртового розчину фенолфталеїну.
3. Проводимо титрування 0,1 М розчином NaOH до утворення світло-рожевого кольору, яке не зникає.
4. Додають 5 мл 20% нейтрального розчину формаліну – спостерігається знебарвлення досліджуваної проби.
5. Проводять повторне титрування 0,1 М розчином розчином NaOH до утворення світло-рожевого кольору.
6. Для розрахунку кількості амінного азоту в досліджуваному зразку, обов'язково враховують, що 1 мл 0,1 М розчин натрій гідроксиду відповідає 1,4 мг амінного азоту. Розрахунок здійснюють за наступною формулою :

$$X = V \cdot 1,4$$

де, V – к-ть р-ну 0,1 М NaOH, що витратилось на титрування; 1,4 - коефіцієнт, що здатен показувати відповідність 1 мл розчину 0,1 М NaOH та маси нітрогену, а саме 14 мг азоту/1 мл 0,1 М NaOH. [95]

Таким чином, з допомогою формольного титрування можна визначити концентрацію джерела азоту, а саме амінного азоту в культуральній рідині.

ВИСНОВКИ

1. Колагеназа — це цільовий ферментний продукт, охарактеризований у даній роботі. Вона є одноланцюговою пептидною молекулою, яка формує третину структуру. Її біологічна активність безпосередньо залежить від присутності іонів цинку, які виконують ключову роль у каталітичному механізмі ферменту.

2. Як біологічний агент для синтезу колагенази обрано *Bacillus megaterium* КМ 369985, який вирізняється серед інших штамів такими перевагами, як непатогенність, висока продуктивність (до 600 Од/мл), а також можливість культивування на простому та доступному поживному середовищі.

3. Колагеназа розглядається як перспективний компонент для створення ін'єкційного лікарського засобу, призначеного для лікування рубцевих змін шкіри, що виникають внаслідок опіків різного походження. Було проаналізовано потребу в даному засобі, а також розраховано потужність виробництва (1,671 м³), на основі якої було встановлено що протягом 90 днів з використанням біореактору на 150 л (за 27 циклів) буде отримано необхідну кількість ферменту.

4. З використанням бази даних KEGG, було детально вивчено та охарактеризовано процес катаболізму ростового субстрату – глюкози за гліколітичним шляхом, а також описано схему синтезу ферменту колагенази, як білкової молекули що складається з 17 амінокислот.

5. Культивування проводиться періодичним глибинним методом із забезпеченням активної аерації. Простий та мінімальний склад поживного середовища не потребує внесення титрувальних та підживлювальних розчинів. Для забезпечення чистоти приміщень було прийнято рішення використовувати такі дезінфікувальні засоби як: «Дезанол екстра» та «Даноксин спеціаль». Для очищення обладнання застосовується «Каустична сода».

6. Також було охарактеризовано та описано технологічну та апаратурну схеми виробництва ферменту колагенази, з наведенням специфікації на виробниче обладнання та устаткування для отримання аераційного повітря.

7. Важливим етапом став опис схеми виділення та очищення (Г20х) продукту з кінцевою ліофілізацією, адже препарат пропонується для застосування в медичній практиці, тому збереження активності та чистоти субстанції є пріоритетним.

8. Наостанок, варто зазначити про наявність детально описаних методів для встановлення концентрації біомаси, а також концентрації джерел вуглецю та азоту (глюкоза та колаген I типу відповідно). Крім того наведено методи, слідуючи яким можна швидко визначити ферментативну активність колагенази та загальну кількість білку в культуральній рідині (метод Azocoll та метод Бретфорда відповідно).

ЛІТЕРАТУРА

1. Юлевич О. І. Біотехнологія : навч. посіб. / О. І. Юлевич, С. І. Ковтун, М. І. Гиль ; за ред. М. І. Гиль. – Миколаїв : МДАУ, 2012. – 476 с.
2. Грегірчак, Н. М. Імобілізовані ферменти і клітини в біотехнології : навч. посібник / Н. М. Грегірчак, М. М. Антонюк, Л. М. Буценко ; Нац. ун-т харч. технол. – Київ: НУХТ, 2015. – 267 с.
3. Мацелюх, О. В. Калогенологічні ферменти мікроорганізмів / О. В. Мацелюх, Л. Д. Варбанець // Біотехнологія. - 2008. - Т. 1, № 3. - С. 13-23.
4. ОПКИ. КЛАСИФІКАЦІЯ. ОПКОВА ХВОРОБА. ЕЛЕКТРОТРАВМА. ВІДМОРОЖЕННЯ. [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://nmu.ua/wp-content/uploads/2016/06/5.pdf>
5. Лазерне видалення рубців і шрамів. [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://laserhealth.com.ua/uslugi/lazernoe-udalenie-rubcov>
6. Хірургічне видалення шрамів – пластика рубця. [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://sensavi.ua/uk/services/khirurgriya/plastyka-rubcyu>
7. Колагеназа. [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://www.watson-int.com/tag/pm/>
8. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. ENZYME: 3.4.24.3 - [Електронний ресурс] - Режим доступу: https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ec:3.4.24.3
9. Буценко, Л. М. Технології мікробного синтезу лікарських засобів : навч. посібник / Л. М. Буценко, Ю. М. Пенчук, Т. П. Пирог ; Нац. ун-т харч. технол. – Київ: НУХТ, 2010. – 323 с.
10. Santra, M., Sharma, M., & Luthra-Guptasarma, M. Studies on *Vibrio mimicus* derived collagenase variants providing insights into critical role (s) played by the FAXWXXT motifs in its collagen-binding domain. *Enzyme and Microbial Technology*. 2021, 147, 109779. doi: 10.1016/j.enzmictec.2021.109779
11. Patel, N. Y., Baria, D. M., Pardhi, D. S., Yagnik, S. M., Panchal, R. R., Rajput, K. N., & Raval, V. H. Microbial enzymes in pharmaceutical industry. In *Biotechnology of Microbial Enzymes*. Brahmachari, G., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2023, pp. 375–403. doi: 10.1016/B978-0-443-19059-9.00025-6

12. Bond, M. D., & Van Wart, H. E. Characterization of the individual collagenases from *Clostridium histolyticum*. *Biochemistry*. 1984, 23(13): 3085-3091. doi: 10.1021/bi00308a036
13. Wu, Q., Li, C., Li, C., Chen, H., & Shuliang, L. Purification and characterization of a novel collagenase from *Bacillus pumilus* Col-J. *Applied biochemistry and biotechnology*, 160. 2010, 129-139. doi: 10.1007/s12010-009-8673-1
14. Гребеник Л. І. Курс лекцій з біохімії. Розділ «Біохімія ферментів» / Л. І. Гребеник, І. Ю. Висоцький. – Суми : СумДУ, 2011. – 72 с.
15. Hoa Bach, T. M., Pham, T. H., Dinh, T. S., & Takagi, H. Characterization of collagenase found in the nonpathogenic bacterium *Lysinibacillus sphaericus* VN3. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2020, 84(11): 2293-2302. doi: 10.1080/09168451.2020.1799748
16. Alcaide-Ruggiero, L., Molina-Hernández, V., Granados, M. M., & Domínguez, J. M. Main and minor types of collagens in the articular cartilage: the role of collagens in repair tissue evaluation in chondral defects. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, 22(24): 13329. doi: 10.3390/ijms222413329
17. Bhagwat, P. K., & Dandge, P. B. Collagen and collagenolytic proteases: A review. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 15. 2018, 43-55. doi: 10.1016/j.bcab.2018.05.005
18. Chaudhary, A. K., Pandya, S., Ghosh, K., & Nadkarni, A. Matrix metalloproteinase and its drug targets therapy in solid and hematological malignancies: an overview. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2013, 753(1): 7-23. doi: 10.1016/j.mrrev.2013.01.002
19. Zhou, S., Tan, P. C., Chiang, C. A., Xie, Y., Zhang, P., Li, Q., & Liu, K. A randomized clinical trial assessing the efficacy of single and multiple intralesional collagenase injections for treating contracted scars. *Chinese Journal of Plastic and Reconstructive Surgery*. 2023, 5(3): 120-125. doi: 10.1016/j.cjprs.2023.08.001
20. Pat. 4524065 USA. Method for the prevention and treatment of scars with enzymes / Sheldon R., Pinnell, Durham, N. C. Publ. 18.06.1985

21. Simildiet. «Collagenase 150 IU». [Электронный ресурс] - Режим доступа: <https://fillerbee.com.ua/ua/simildiet-collagenaza-150me/p1199>
22. MCCosmetics. «Collagenase 1500 IU». [Электронный ресурс] - Режим доступа: https://bigl.ua/ua/p1685242261-collagenase-1500?utm_source=pmax&utm_medium=cpa&utm_content=ru&utm_campaign=top_sell_ru_low_mode&gad_source=1&gclid=Cj0KCQjwv_m-BhC4ARIsAIqNeBsd_R4Q3mf-VJam98yjUA_d4iy03jUtuCICZiJaPaDrbjYsfQciUOcaArCXEALw_wcB
23. Collagenase. [Электронный ресурс] - Режим доступа: <https://advancedbiomatrix.com/collagenase.html>
24. Collagenase P. [Электронный ресурс] - Режим доступа: <https://www.sigmaaldrich.com/UA/en/product/roche/collpro>
25. Duarte, A. S., Correia, A., & Esteves, A. C. Bacterial collagenases—a review. *Critical Reviews in Microbiology*. 2016, 42(1): 106-126. doi: 10.3109/1040841X.2014.904270
26. Savita, K., & Arachana, P. Production of collagenase by *Bacillus* KM369985 isolated from leather sample. *Int. J. Res. Biosciences*. 2015, 4(4): 81-87.
27. Lima, L. A., Cruz Filho, R. F., Santos, J. G. D., & Silva, W. C. Protease with collagenolytic activity produced by *Bacillus* sp. DPUA 1728 from Amazonian soil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2015, 46(4): 1217-1223. doi: 10.1590/S1517-838246420130656
28. 70192 Mueller Hinton Broth (M-H Broth). [Электронный ресурс] - Режим доступа: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/152/408/70192dat.pdf>
29. 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. Production and characterization of collagenase from a new Amazonian *Bacillus cereus* strain. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. 2019, 49(5): 501-509. doi: 10.1080/10826068.2019.1587627
30. Scholle, M. D., White, C. A., Kunnimalaiyaan, M., & Vary, P. S. Sequencing and characterization of pBM400 from *Bacillus megaterium* QM B1551. *Applied and*

- environmental microbiology*. 2003, 69(11): 6888-6898. doi: 10.1128/AEM.69.11.6888-6898.2003
31. Goswami, G., Panda, D., Samanta, R., Boro, R. C., Modi, M. K., Bujarbaruah, K. M., & Barooah, M. *Bacillus megaterium* adapts to acid stress condition through a network of genes: Insight from a genome-wide transcriptome analysis. *Scientific Reports*. 2018, 8(1): 16105. doi: 10.1038/s41598-018-34221-0
32. Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H. and Whitman, W., Eds. (2009) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd Edition, Vol. 3, Springer-Verlag, New York.
33. Bunk, B., Schulz, A., Stammen, S., Münch, R., Warren, M. J., Jahn, D., & Biedendieck, R. A short story about a big magic bug. *Bioengineered bugs*. 2010, 1(2): 85-91. doi: 10.4161/bbug.1.2.11101
34. *Bacillus megaterium*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tgw1916.net/Bacillus/megaterium.html>
35. *Bacillus megaterium*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://atlas.sund.ku.dk/microatlas/food/bacteria/Bacillus_megaterium/
36. Smith & Nephew. Collagenase SANTYL. [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://santyl.com/>
37. Frederick, R. E., Bearden, R., Jovanovic, A., Jacobson, N., Sood, R., & Dhall, S. Clostridium collagenase impact on zone of stasis stabilization and transition to healthy tissue in burns. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, 22(16): 8643. doi: 10.3390/ijms22168643
38. Федченко, Ю., & Шихова, Є. Опіки від вибухів фосфорних бомб, особливості надання екстренної допомоги при цьому // Scientific Collection «InterConf», 160. 2023, 230-233.
39. Колагеназа. [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://enzim.ua/index.php?page=collagenase&lng=uk>
40. Іруксан гель 30 г. [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://zdravica.ua/iruksan-gel-30g-of-00050812>

41. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. [Електронний ресурс]. Режим доступу : <https://www.genome.jp/pathway/bmeg00500>
42. Пирог Т. П. Загальна мікробіологія : підручник, 2-е вид., доп. і перероб. / Т. П. Пирог. – К. : НУХТ, 2010. – 632 с.
43. Пенчук Ю.М. Загальна біотехнологія. [Електронний ресурс]: Конспект лекцій для здобув. освітнього рівня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-проф. прог. «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навч./ Ю. М. Пенчук. – К.: НУХТ, 2019. – 80 с.
44. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.
45. Карлаш, Ю. В. Основи проєктування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс] : навч. посібник / Ю. В. Карлаш, В. О. Красінько ; Національний університет харчових технологій. – Київ : НУХТ, 2022. – 373 с.
46. BR500-M1-150L Microbial Fermentation System Technical Specifications. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://files.lab1st.com/documents/BR500-M1-150L%20Lab1st%20Bioreactor%20V1.231025.pdf>
47. Фільтр ФЯП. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://ventilator.ua/product/filtr_fyap/#technical
48. Пирог Т. П. Загальна біотехнологія [Електронний ресурс]: підручник / Т. П. Пирог, О. А. Ігнатова. - К.: НУХТ, 2009. - 336 с.
49. Компактні кишенькові фільтри вентиляції ФВКОМ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://newfilter.com.ua/ua/ventilacia/kompaktni-kishenkovi-filtri-_-povitryani-kompaktni-filtri-ventilyatsiyi.html
50. Повітряний фільтр Ultradept II P-SRF. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.moodydirect.com/wp-content/resources/engineeringcatalogue/ultrafilter-ultradeptii-psrf.pdf>

51. Грегірчак Н.М. Мікробіологія, санітарія і гігієна виробництв з основами НАССР [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання / Н.М. Грегірчак – К.: НУХТ, 2020. – 177 с.
52. Програма переддипломної практики для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» денної форми навчання [Електронний ресурс] / уклад.: В.О. Красінько. Ю.М. Резніченко, — К.: НУХТ, 2022. -22 с.
53. Каустична сода. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://sata-group.com.ua/ua/p1615813768-kausticheskaya-soda-granulirovannaya.html?srsltid=AfmBOoqWXXPVRbx5aYVaKk4vQHQ0MMcSC4SaTZ5G78xsJ3vwJqTUjJcI>
54. «Чистолاین-універсал». Інструкція. [Електронний ресурс]. Режим доступу: chrome-extension://efaidnbnmnnibpcajpcglefindmkaj/https://mdmgroup.com.ua/image/catalog/product/MDM/Sanilit_ST/instruction/dezuniversal.pdf
55. «Чистолاین-універсал». [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://mdmgroup.com.ua/myyucha-dezinfekciya/zasib-dezinfekcijnyj-myjnyj-chystolajn-universal#MED010798>
56. «Дезанол екстра». Методичні вказівки. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [file:///C:/Users/HP/Downloads/mv_dezanol_ekstra_2015%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/HP/Downloads/mv_dezanol_ekstra_2015%20(1).pdf)
57. «Дезанол екстра». [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p2472900159-dezanol-ektra.html>
58. «Террацид Айсід». Інструкція. [Електронний ресурс]. Режим доступу: file:///C:/Users/HP/Downloads/terratsid_ajsid_nstrukts_zastosuvannya_zasobu.pdf
59. «Террацид Айсід». [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://hlorka.in.ua/ua/p2512257986-terratsid-ajsid->

1000.html?srsltid=AfmBOopXZjcsXiKj4PoPBCpdoy5JfHcg0F2R_jo497OsIgxdltoD0ciD

60. «Даноксин спеціаль». Інструкція. [Електронний ресурс]. Режим доступу: file:///C:/Users/HP/Downloads/danoksin_spetsial_nstrukt_zastosuvannya_zasobu.pdf
61. «Даноксин спеціаль». [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://hlorka.in.ua/ua/p2511820060-danoksin-spetsial.html?srsltid=AfmBOopgytXkxKv4s_cNOJ2_urLCYF_0pAe2yL3sK70PgDmx5PUxzS3F
62. «Blanidas soft des». Інструкція. [Електронний ресурс]. Режим доступу: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://horeca-service.net/wp-content/uploads/2019/06/Instruktsiya-Blanidas-soft-dez-2017.pdf?srsltid=AfmBOopZ2fY_efMfKo3GWKEL8alzOCm0MVre9Yl6-SNktVmHRnbBUQmK
63. «AHD 2000 express». Інструкція. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://horeca-service.net/wp-content/uploads/2020/10/Instruktsiya-AHD-2000-ekspres-14.01.20.pdf?srsltid=AfmBOorVflNtfJSGrI0MjBCduNDyX48VIQkyU6yt1TYjIXT9MpEwT0DG>
64. Biostat® Cplus The Stainless Steel Fermenter | Bioreactor for Your Laboratory. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.sartorius.com/download/9612/10/broch-biostat-cplus-sbi1505-e-data.pdf>
65. Апарати сталіні емальовані з механічним змішуючим пристроєм. [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://euromash.kiev.ua/ua/aparati_emal_mehanicheskim_perem_ustroystvom_ua.php
66. León-López, A., Morales-Peñaloza, A., Martínez-Juárez, V. M., Vargas-Torres, A., Zeugolis, D. I., & Aguirre-Álvarez, G. Hydrolyzed collagen—sources and applications. *Molecules*. 2019, 24(22): 4031. doi: 10.3390/molecules24224031
67. Основи проектування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: метод. рекомендації до викон. курс. проекту для здобувачів вищої освіти освіт. ступ.

«бакалавр» спец.162 ««Біотехнології та біоінженерія» осв.-проф. прогр. «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» ден. форми навч./ уклад. Т.П. Пирог, Ю.В. Карлаш, В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2022. – 79 с.

68. Шахта приточна. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://agroprolisok.com.ua/ua/p1164641931-shahta-pritochnaya-d650.html>
69. ID TURBO COMPRESSOR T2. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dalgakiran.ua/uk/products/centrobizhni-kompresory-ih-dalgakiran-seriyi-t2/>
70. Охолоджувач повітря Jh 18APV (D,S). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tdfavorit.com.ua/ua/p493549575-ohladitel-vozduha-jhcool.html>
71. Ресивер серії РВ 900. 818.01. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tusk.ua/ua/product/resiver-vozdushnyij-lider-10-bar-900-l-rv90081801-dlya-kompressora/>
72. Підігрівач стисненого повітря АН-8500. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.cryosnow.com/en/accessories/compressed-air-conditioning/compressed-air-heater-for-blasting-pistol-jp-25/compressed-air-heater-ah-8500/>
73. Лічильник холодної води Gross ETR-C(H) 15/110 R50H/40V. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://epicentrk.ua/ua/shop/lichlynyk-kholodnoi-vody-gross-etr-c-h-15-110-r50h-40v-bez-zghoniv.html>
74. Рідинно-кільцевий насос ВЕ-М 14. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://bts.net.ua/ua/pumping-equipment-distillery/wort-pumps/be-m-14-r-dinno-k-iceviy-nasos/>
75. Pat. CN103468613B. Bacillus megatherium, method for preparing microbial inoculum through solid fermentation of bacillus megatherium and application of microbial inoculum / Sun Meiquanqun, Chen Qiuhong Xia, Fei Gaoliang Shi, Daling Zhang Xianzhong, He Yijin Chen, Lin Liu Junmei. Publ. 12.09.13.
76. Буценко Л.М., Пенчук Ю.М., Пирог Т.П. Технології мікробного синтезу лікарських засобів: Навч. посіб. — К.: НУХТ, 2010. — 323 с.
77. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс] : Навч. посіб. — К.: НУХТ, 2022. — 373 с.

78. Центрифуги осаджувальні, горизонтальні зі шнековим вивантаженням осаду типу ОГШ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://frunze.com.ua/wp-content/uploads/2023/06/Centrifuge_04-21.pdf
79. Pat. 9,738,883 US B2. Process for the production and purification of the collagenase enzyme from *Vibrio alginolyticus* / Vaccaro S., Caputo M., Cuppari C., Gennari G. Publ. 22.08.17.
80. Фосфатний буфер 0,01 М рН 7,3 +/- 0,1. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://labtime.ua/uk/fosfatnyy-bufer-0-01-m-ph-7-3--0-1-p27444>
81. Tchessalov, S., Maglio, V., Kazarin, P., Alexeenko, A., Bhatnagar, B., Sahni, E., & Shalaev, E. Practical advice on scientific design of freeze-drying process: 2023 update. *Pharmaceutical research*. 2023, 40(10): 2433-2455. doi: 10.1007/s11095-023-03607-9
82. Характеристика обладнання для подрібнення. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://studfile.net/preview/3741032/page:6/>
83. Технологічне обладнання для переробки сировини і напівфабрикатів розділенням. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://elib.lntu.edu.ua/sites/default/files/elib_upload/%D0%9F%D0%BE%D1%81%D1%96%D0%B1%20%D0%A1%D0%B0%D0%B9/page9.html
84. Процеси сортування. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://studfile.net/preview/9469361/page:7/>
85. Сріблястий Дой-пак із замком Zip-Lock, 100 г (130*200 мм). [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://fpack.com.ua/dojj-pak-100-gramm-serebro-bez-klapana?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=pmax-http-don-pak_roas&utm_content=&utm_term=&gad_source=1&gad_campaignid=22328980300&gbraid=0AAAAAqjSkoHRcAYaFIFdKxJRLGjn5uEob&gclid=CjwKCAjw24vBBhA BEiwANFG7y_5U938AcF62l-sC9HkegssoGWGmRLGu7-FUileNEqF2ivdGodGA-xoCNcUQAvD_BwE

86. Біологія клітин: [Електронний ресурс] лаб. практикум для здобувачів освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» ден. та заоч. форм навчання / уклад.: В.О. Красінько, Т.О. Белемець. – К.: НУХТ, 2018. – 110 с.
87. Мотроненко В.В. Біотехнологія та біоінженерія. Частина 1. Основи біотехнології рекомендації до виконання практичних робіт: навчальний посібник / В.В. Мотроненко, Т. М. Луценко, Л. М. Дронько// - Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2022. – 96 с.
88. Wensar Single Beam UV-VIS Spectrophotometer, LMSP-UV1000B [Електронний ресурс]. Режим доступу : https://gloriaexports.com/product/wensarsinglebeamuvvisspectrophotometerlmspuv1000b/?utm_source=Google+Shopping&utm_medium=cpc&utm_campaign=USA&gad_source=4&gclid=CjwKCAiA3JCvBhA8EiwA4kujZtfyFti1kqjL7ODrUB5MBjIhx4EiK00S0zhQ15KSpOBsStsJilpsYBoCqmsQAvD_BwE
89. Технологія мікробного синтезу лікарських засобів [Електронний ресурс]: Лабор. практикум для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» ден. і заоч. форм навч. / Л.М. Буценко, С.М. Тетеріна, В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2022. – 102 с.
90. Nouroozi, R. V., Noroozi, M. V., & Ahmadizadeh, M. Determination of protein concentration using Bradford microplate protein quantification assay. *Disease and Diagnosis*. 2015, 4(1): 11-17. doi: 10.31661/iejm158
91. Prakash Jain B., Pandey S., Goswami S. K. Estimation of Proteins by the Bradford Method. *Protocols in Biochemistry and Clinical Biochemistry*. 2025. P. 87–88. doi: 10.1016/B978-0-443-13945-1.00013-4
92. Методичні вказівки для підготовки до практичних занять з біологічної хімії (для студентів медичних факультетів). Частина 2. Біохімія гормонів. Обмін вуглеводів і ліпідів. / Упор. О.А. Наконечна, С.О. Стеценко. – Харків: ХНМУ, 2017. – 98 с.
93. Лабораторний струшувач для пробірок Вортекс В-7М. [Електронний ресурс]. Режим доступу : <https://prostoprylad.com.ua/4-vorteks-v-7m>

94. Baker, W. L. Glucose oxidase reaction for estimation of glucose without horseradish peroxidase. Some microbiological and fermentation applications. *Journal of the Institute of Brewing*. 1991, 97(6), 457-462. doi: 10.1002/j.2050-0416.1991.tb01086.x
95. Визначення нітрогену амінних груп методом формольного титрування. [Електронний ресурс]. Режим доступу : <https://stemua.science/%D0%9C%D0%B5%D1%82%D0%BE%D0%B4%D0%B8%D0%BA%D0%B8/2807-2/>
96. Lima, C. A., Filho, J. L. L., Neto, B. B., Converti, A., Carneiro da Cunha, M. G., & Porto, A. L. Production and characterization of a collagenolytic serine proteinase by *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622: A factorial study. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 16. 2011, 549-560. doi: 10.1007/s12257-010-0247-0

ДОДАТКИ

Додаток 1

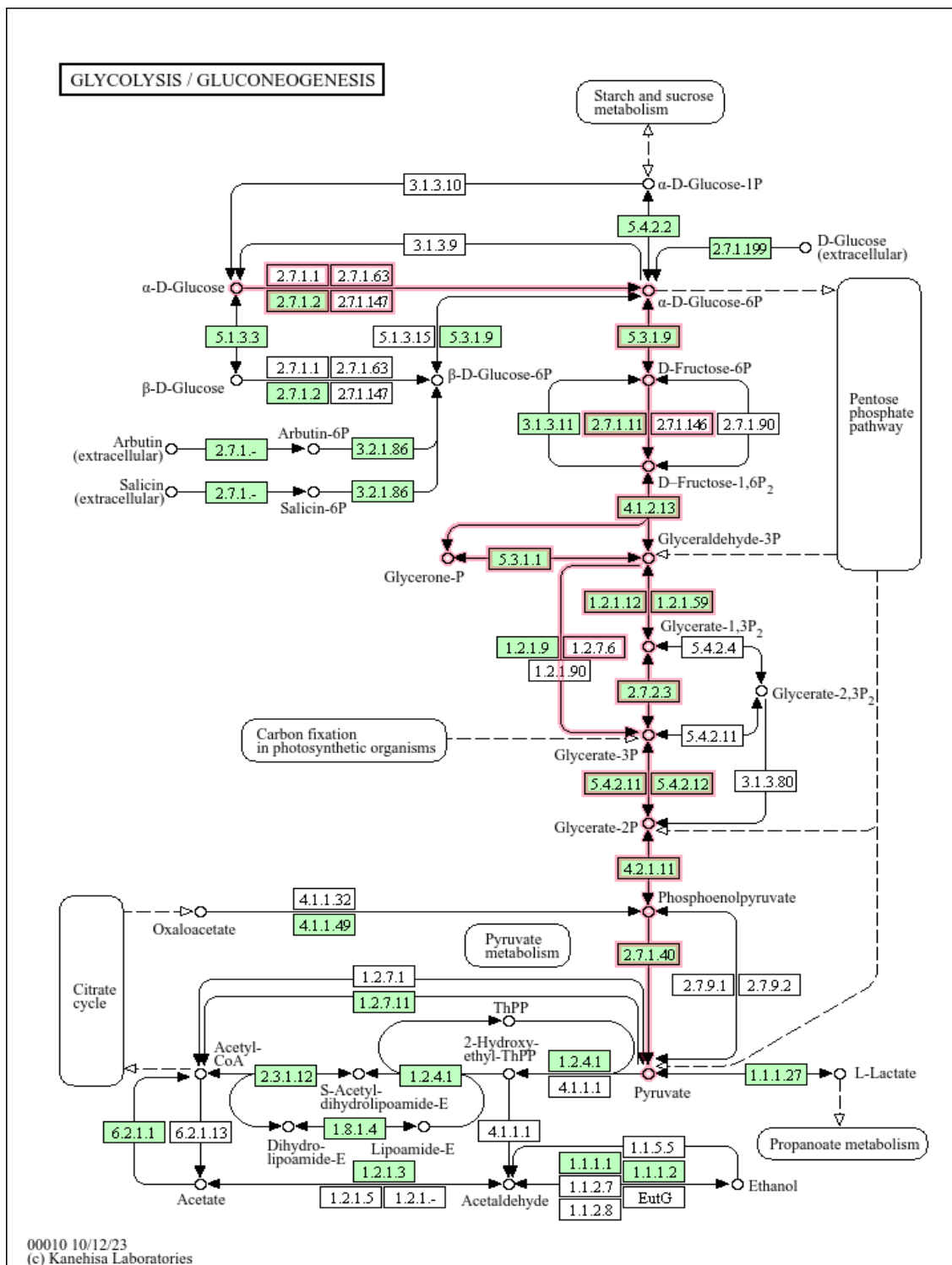


Гліколіз / глюконеогенез - *Bacillus megaterium* NBRC 15308 = ATCC 14581

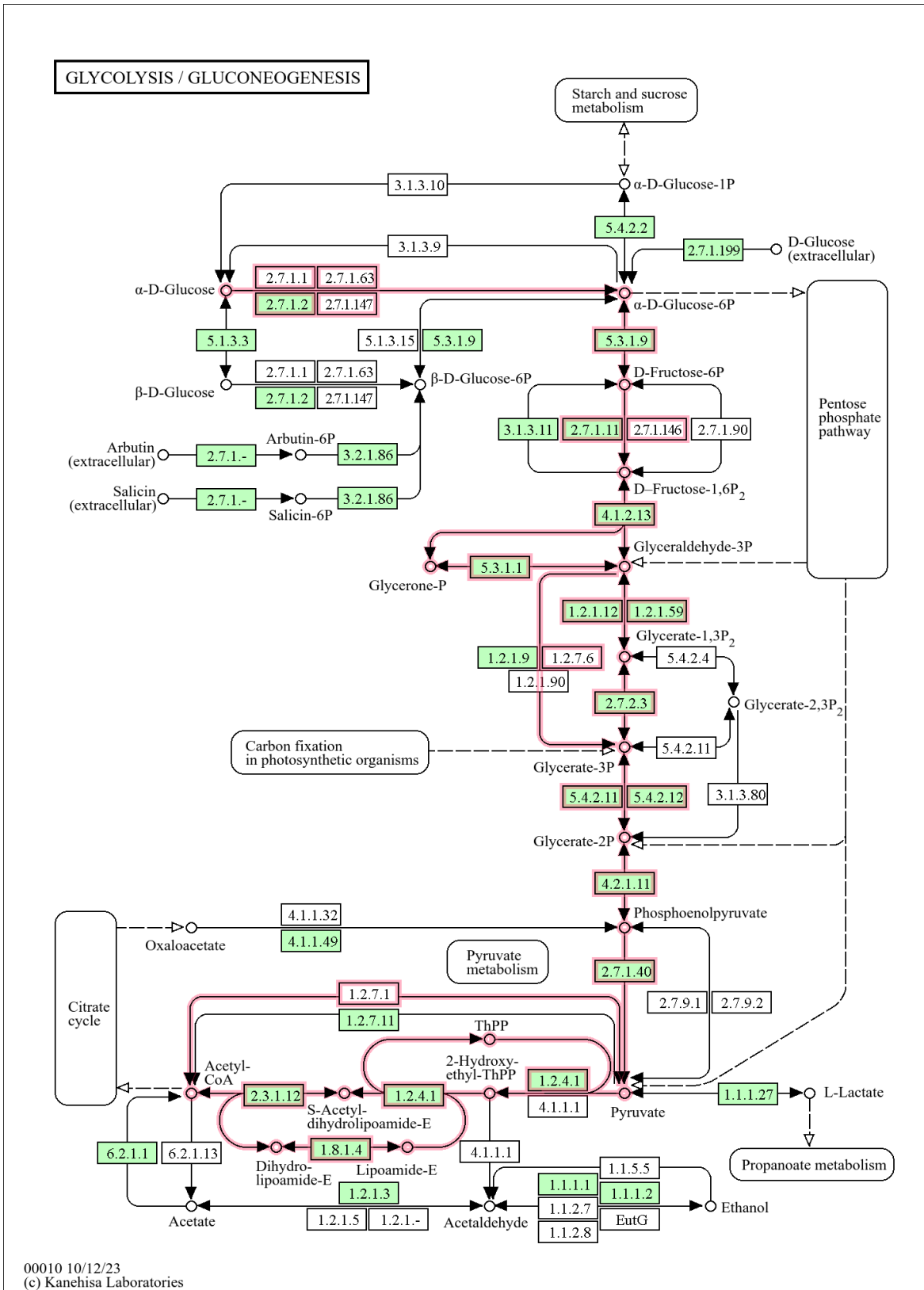
[Меню шляху | Меню організму | Вхід до шляху | Показати опис | Завантажити | Довідка]

Змінити тип шляху

Гліколіз.



Перетворення пірвату в ацетил-КоА.

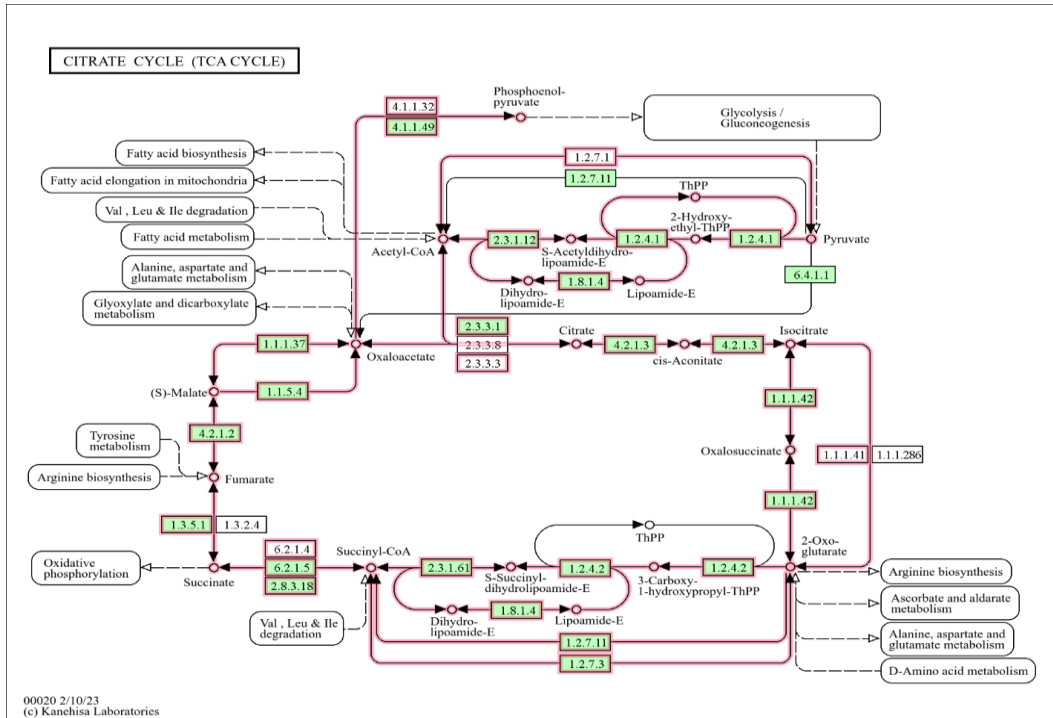


KfGG Цитратний цикл (цикл ТСА) - *Vacillus megaterium* NBRC 15308 = ATCC 14581

[Меню шляху | Меню організму | Вхід до шляху | Показати опис | Завантажити | Довідка]

Змінити тип шляху

Цикл трикарбонових кислот разом з анаплеротичними реакціями.

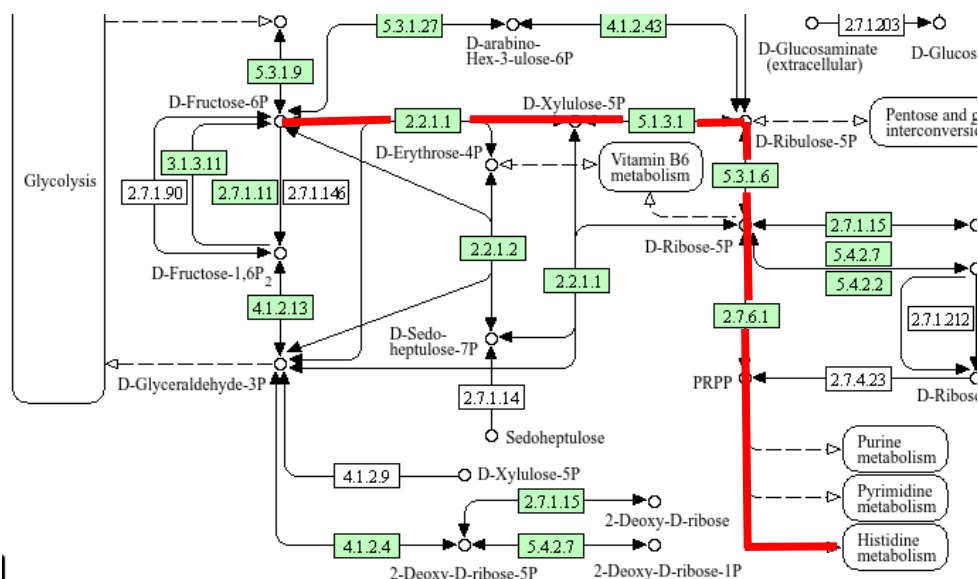


KfGG Пентозофосфатний шлях - *Vacillus megaterium* NBRC 15308 = ATCC 14581

[Меню шляху | Меню організму | Вхід до шляху | Показати опис | Завантажити | Довідка]

Змінити тип шляху

Перетворення фруктозо – 6 – фосфату в фосфорибозилпірофосфат та гістидин.

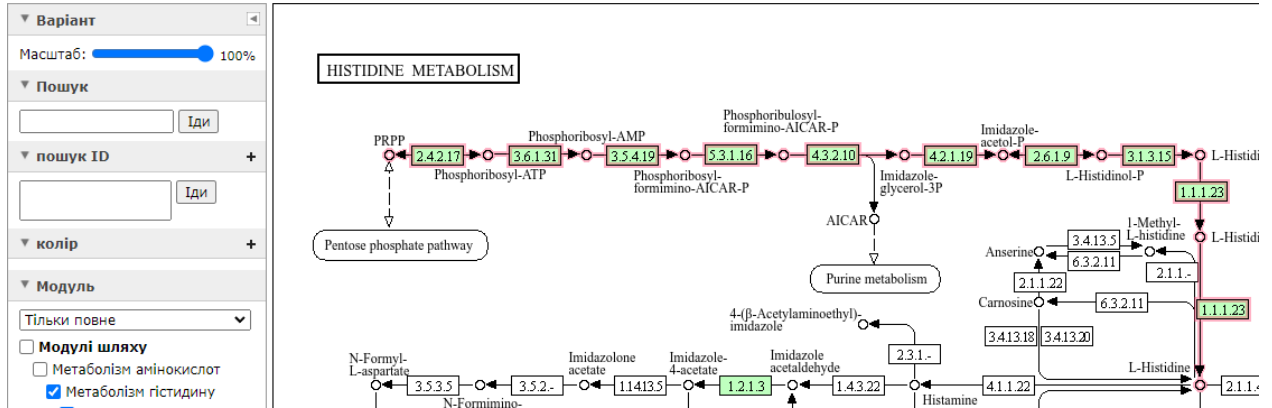


Синтез гістидину з фосфорибозилпірофосфату.

KEGG Метаболізм гістидину - *Bacillus megaterium* NBRC 15308 = ATCC 14581

[Меню шляху | Меню організму | Вхід до шляху | Завантажити | Довідка]

Змінити тип шляху

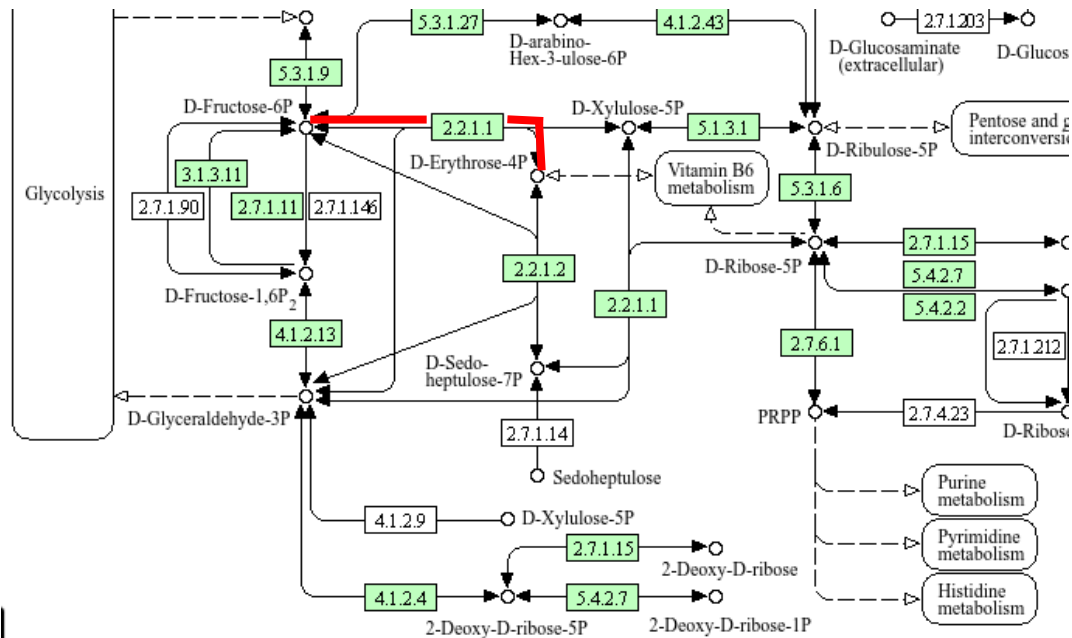


KEGG Пентозофосфатний шлях - *Bacillus megaterium* NBRC 15308 = ATCC 14581

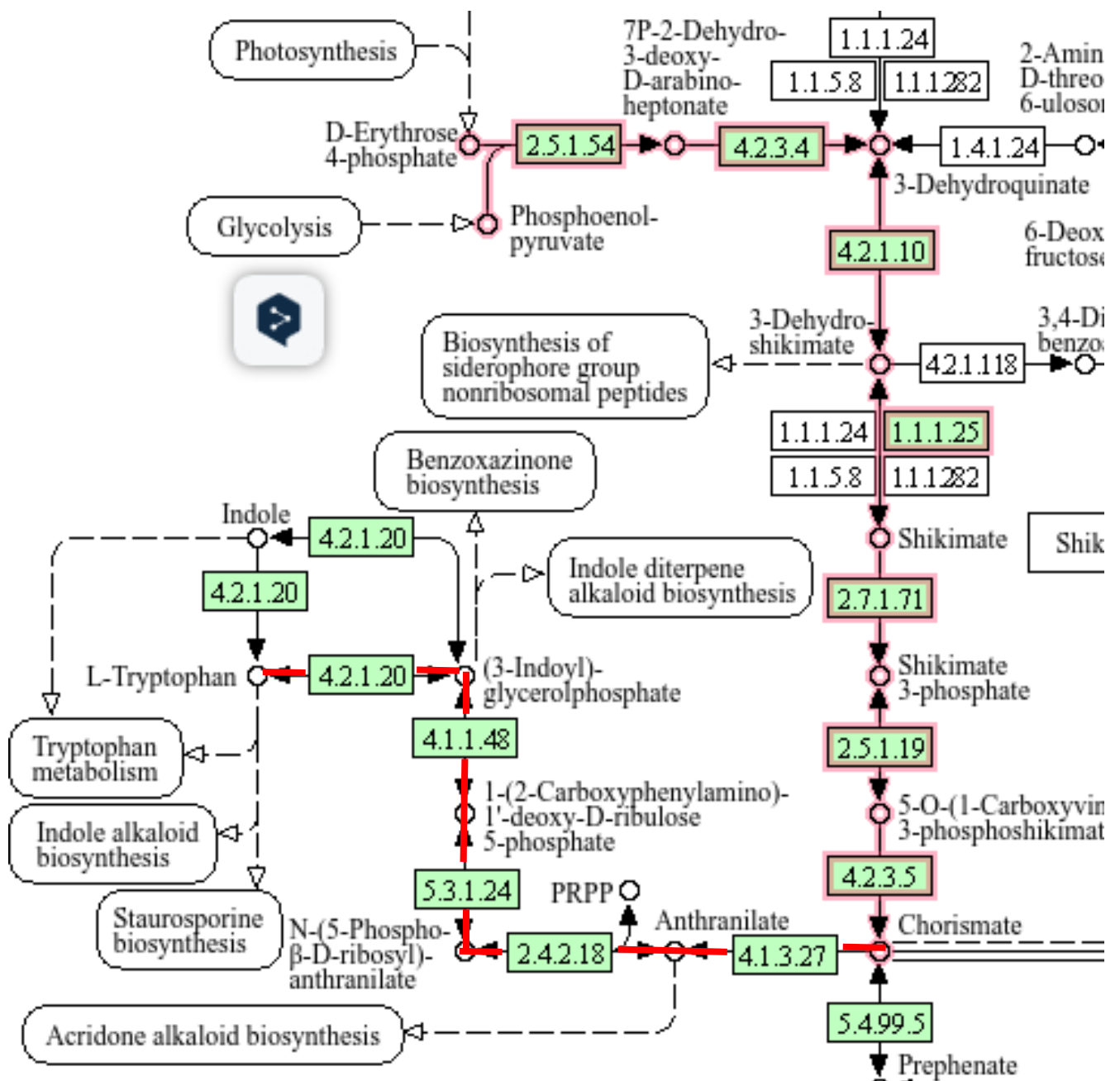
[Меню шляху | Меню організму | Вхід до шляху | Показати опис | Завантажити | Довідка]

Змінити тип шляху

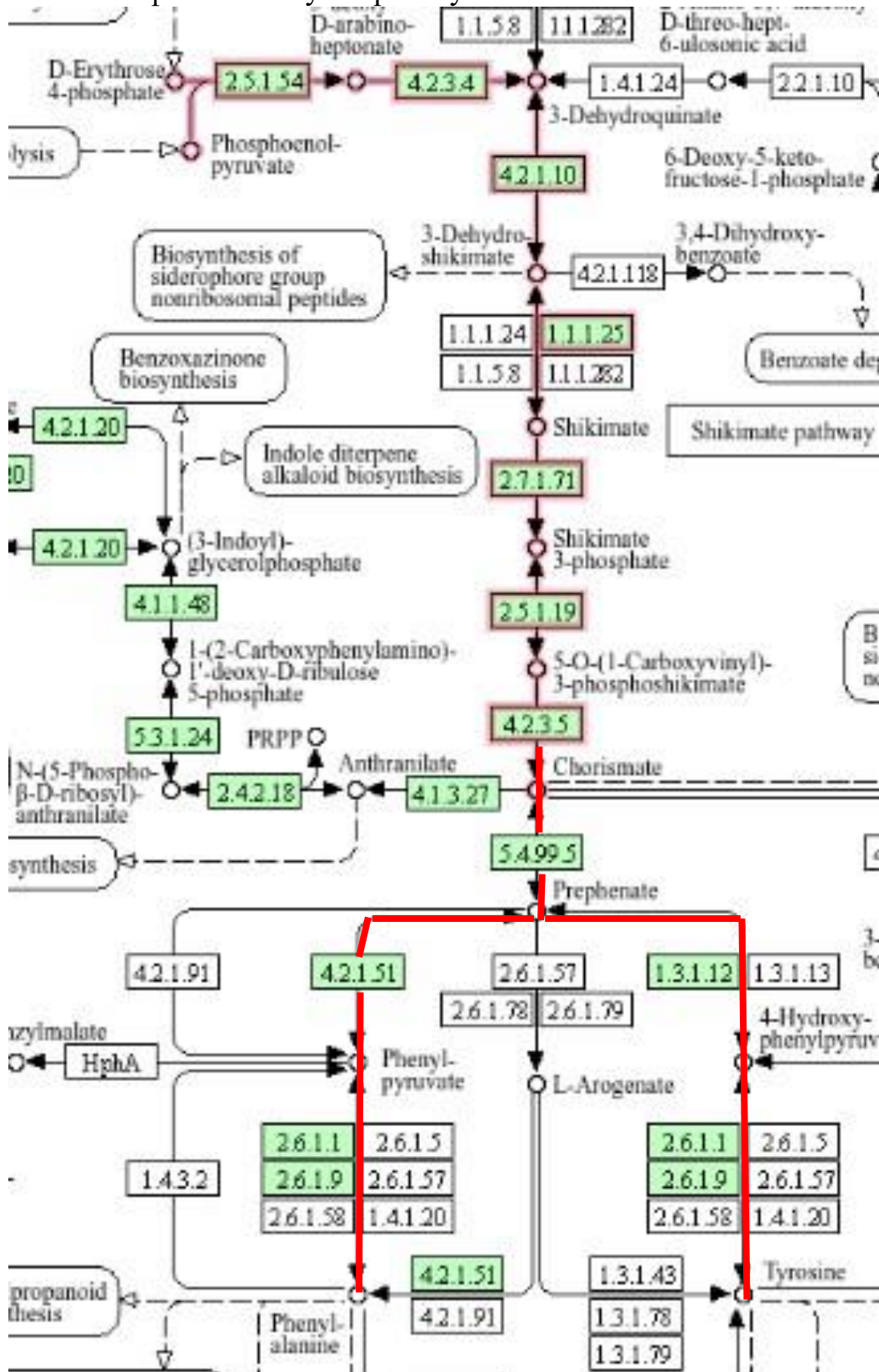
Перетворення фруктозо – 6 – фосфату в еритрозо – 4 – фосфат.



Біосинтез триптофану з ФЕП та еритрозо – 4 фосфату.



Біосинтез фенілаланіну і тирозину.



Змінити тип шляху

Синтез серину з 3 – фосфогліцерату.

Варіант

Масштаб: 100%

Пошук

пошук ID

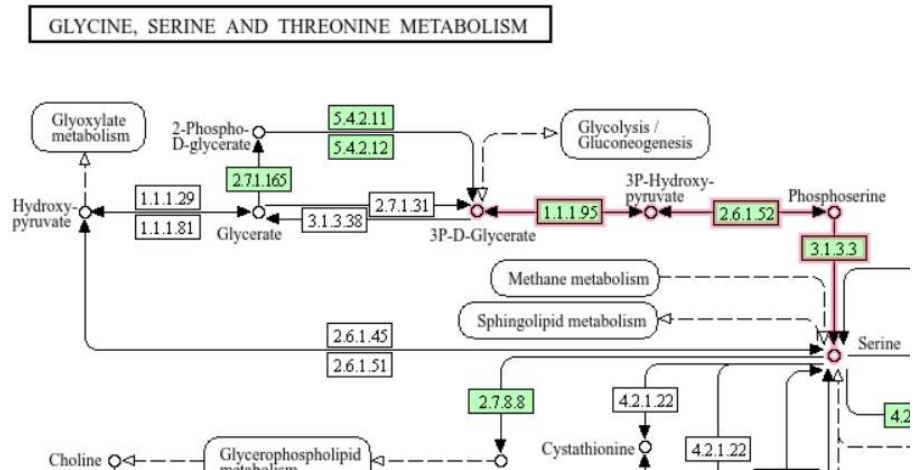
Колір

Модуль

Тільки повне

Модулі шляху

- Метаболізм амінокислот
- Метаболізм серину і треоніну
- M00020 Біосинтез серину



Змінити тип шляху

Синтез гліцину з серину.

Масштаб: 100%

Пошук

пошук ID

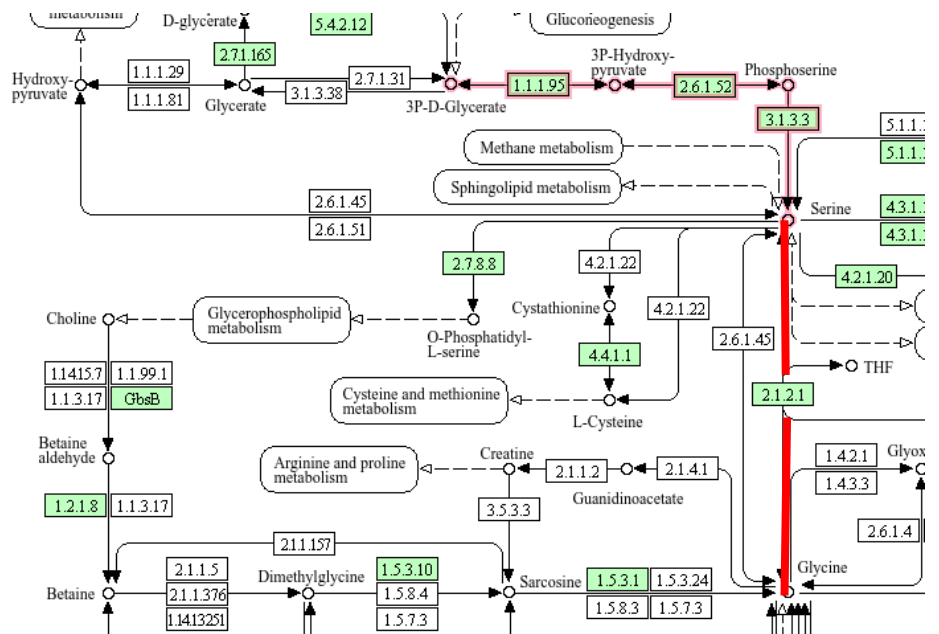
Колір

Модуль

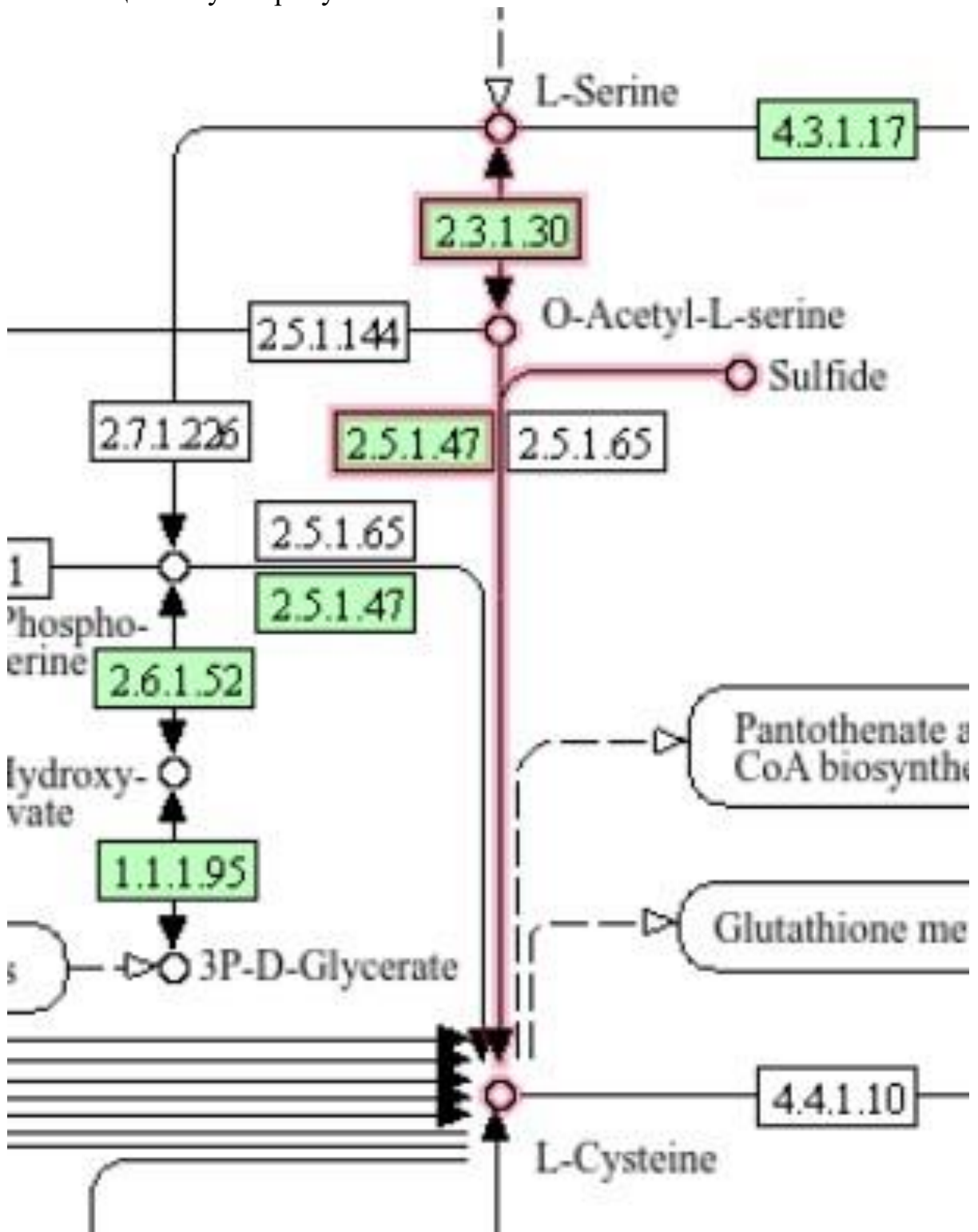
Тільки повне

Модулі шляху

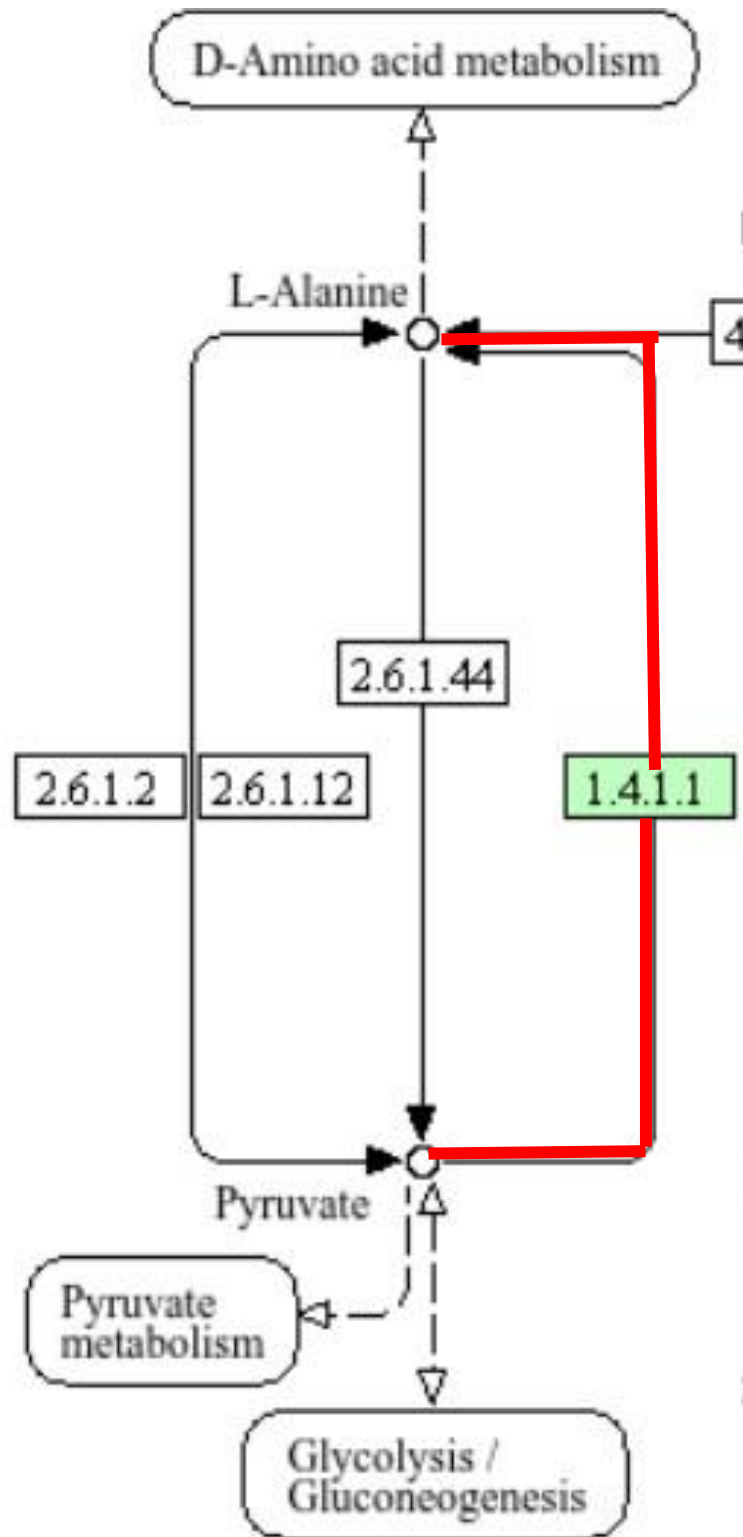
- Метаболізм амінокислот
- Метаболізм серину і треоніну
- M00020 Біосинтез серину
- M00018 Біосинтез треоніну
- M00621 Система розщеплення
- M00555 Біосинтез бетайну



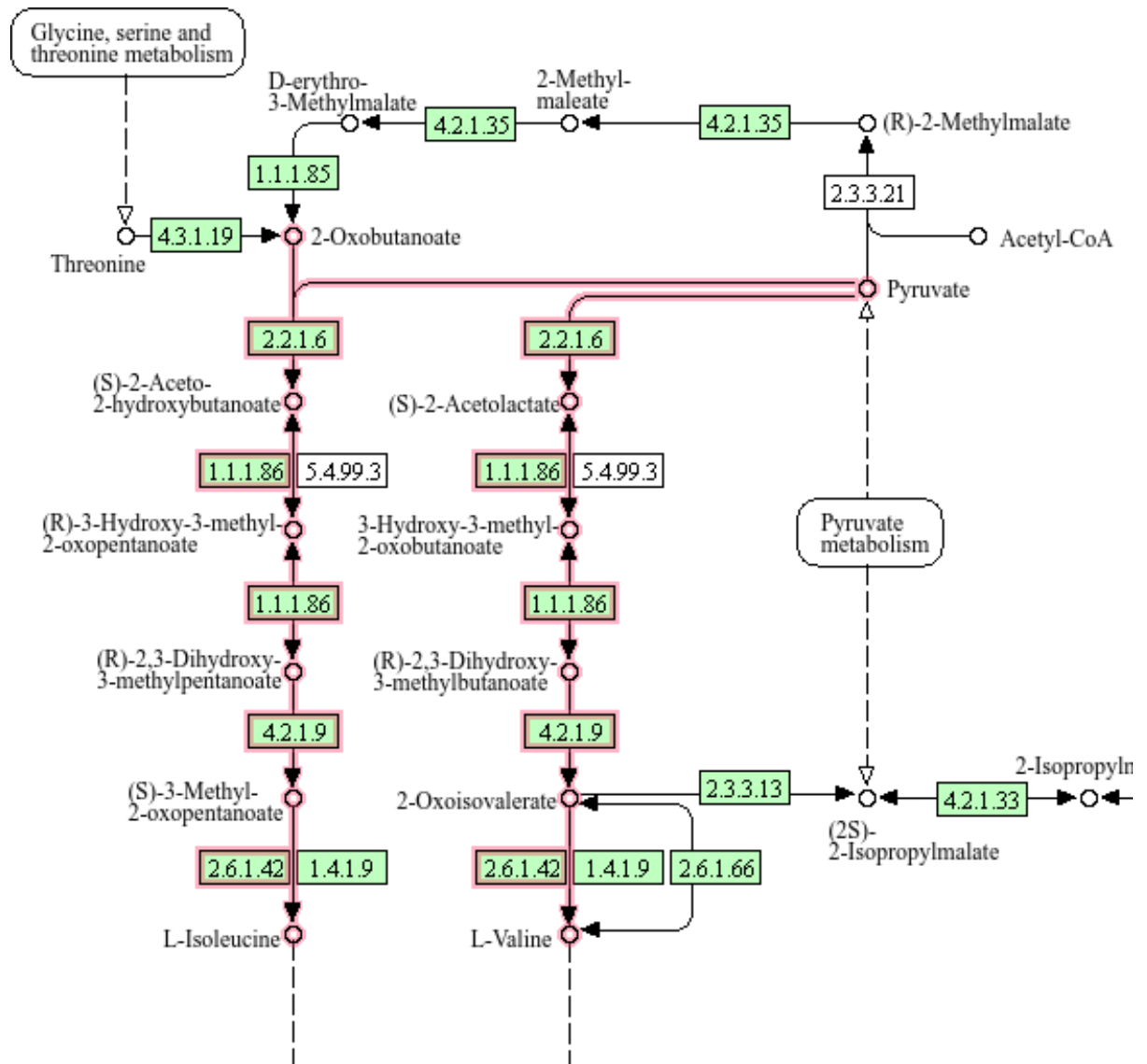
Синтез цистеїну з серину.



Синтез аланіну з пірувату.



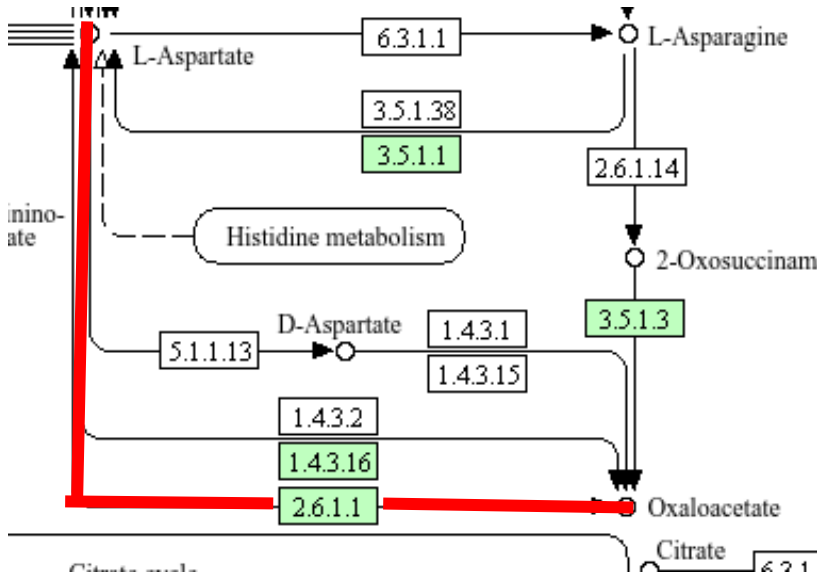
Синтез валіну і лейцину з пірувату.



[Меню шляху | Меню організму | Вхід до шляху | Завантажити | Довідка]

Змінити тип шляху

Синтез аспартату з оксалоацетату.

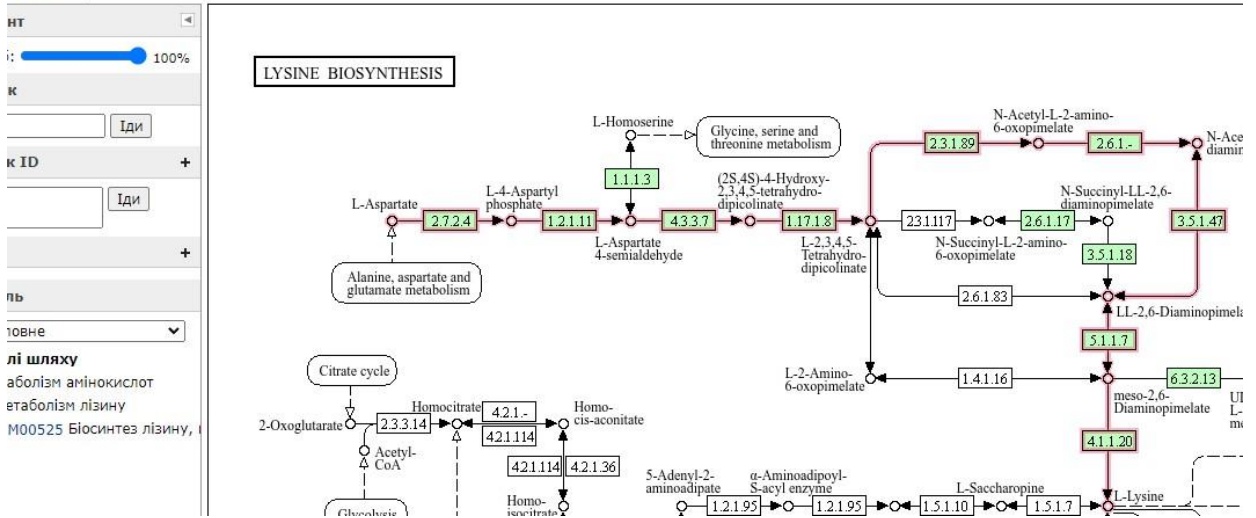


Біосинтез лізину з аспартату.

Біосинтез лізину - *Bacillus megaterium* NBRC 15308 = ATCC 14581

шляху | Меню організму | Вхід до шляху | Завантажити | Довідка]

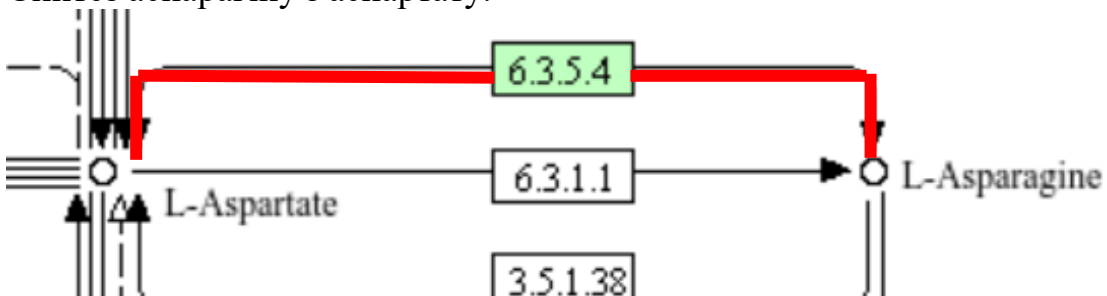
тип шляху



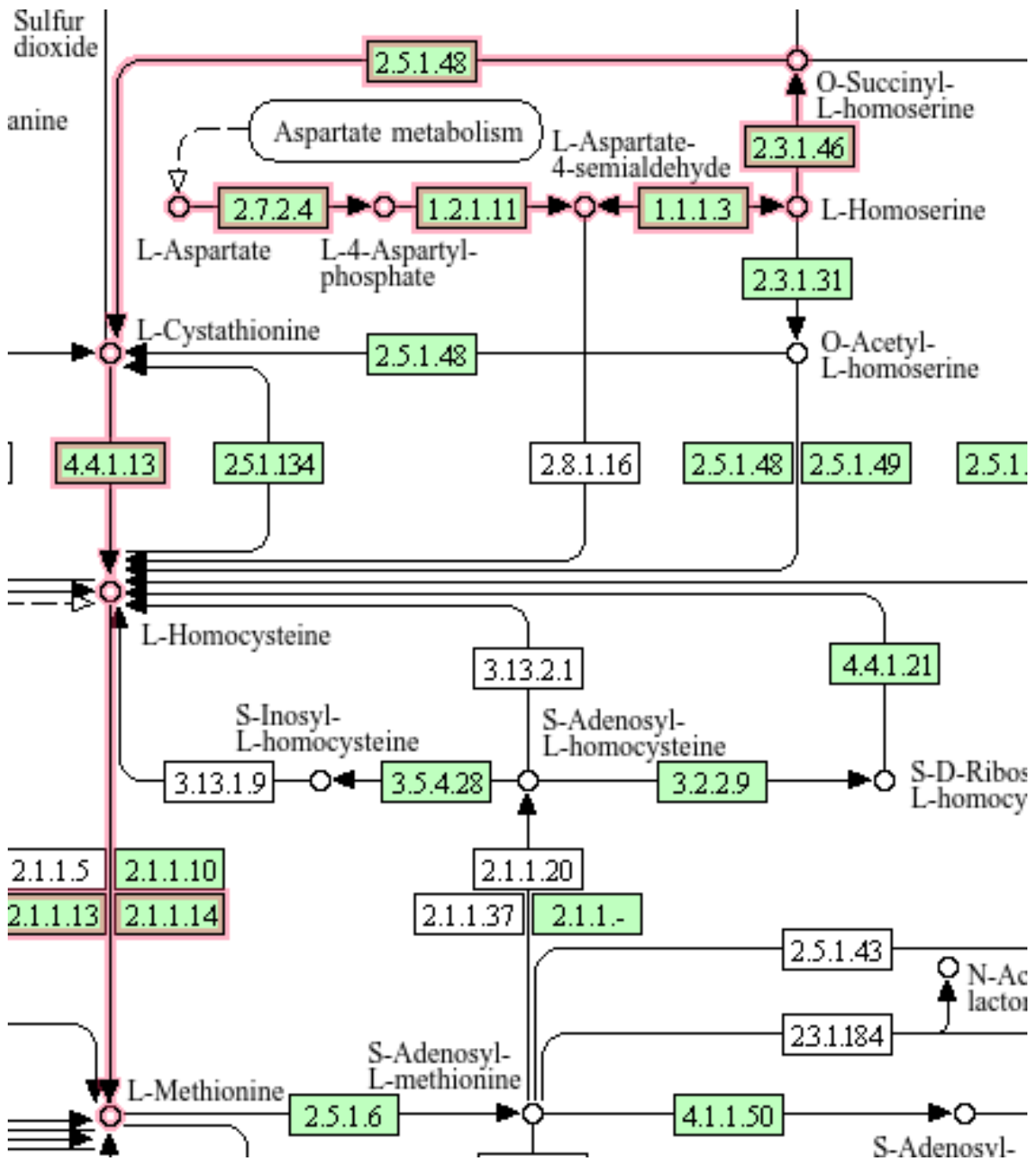
[Меню шляху | Меню організму | Вхід до шляху | Завантажити | Довідка]

Змінити тип шляху

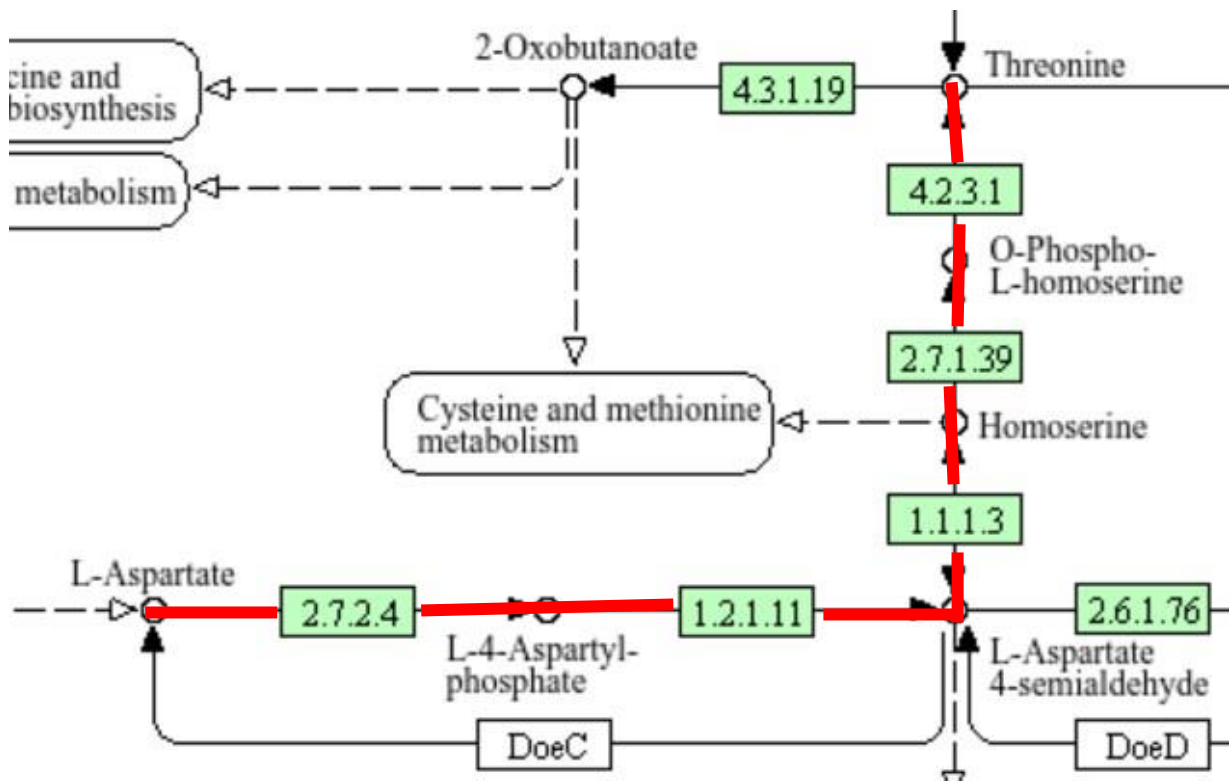
Синтез аспарагіну з аспартату.



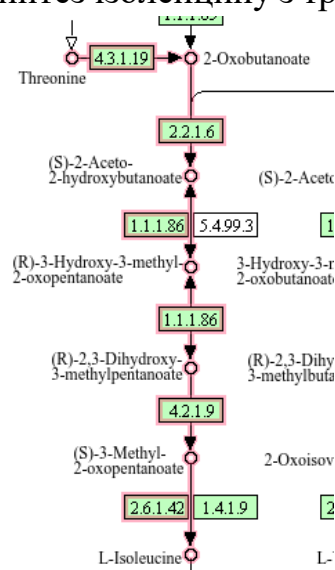
Синтез метіоніну з аспартату.



Синтез треоніну з аспартату.



Біосинтез ізолейцину з треоніну.

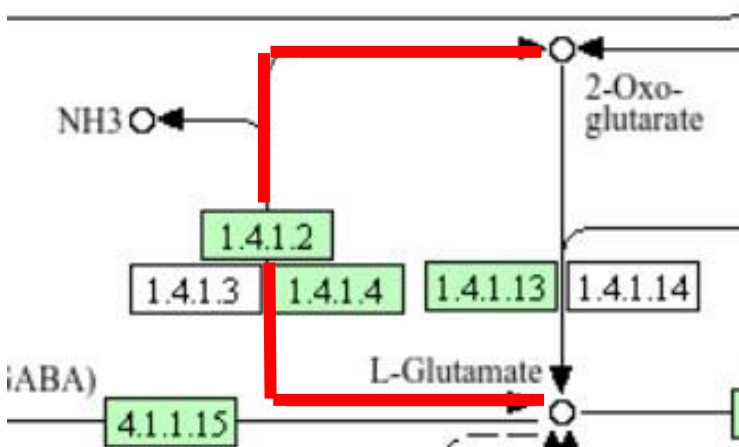


[Меню шляху | Меню організму | Вхід до шляху | Завантажити | Довідка]

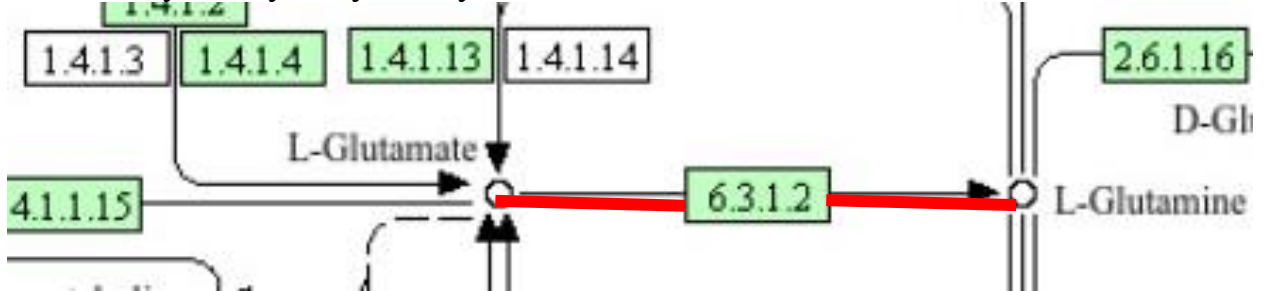
Змінити тип шляху

Синтез глутамату з 2 – оксоглутарату.

Citrate cycle



Синтез глутаміну з глутамату.

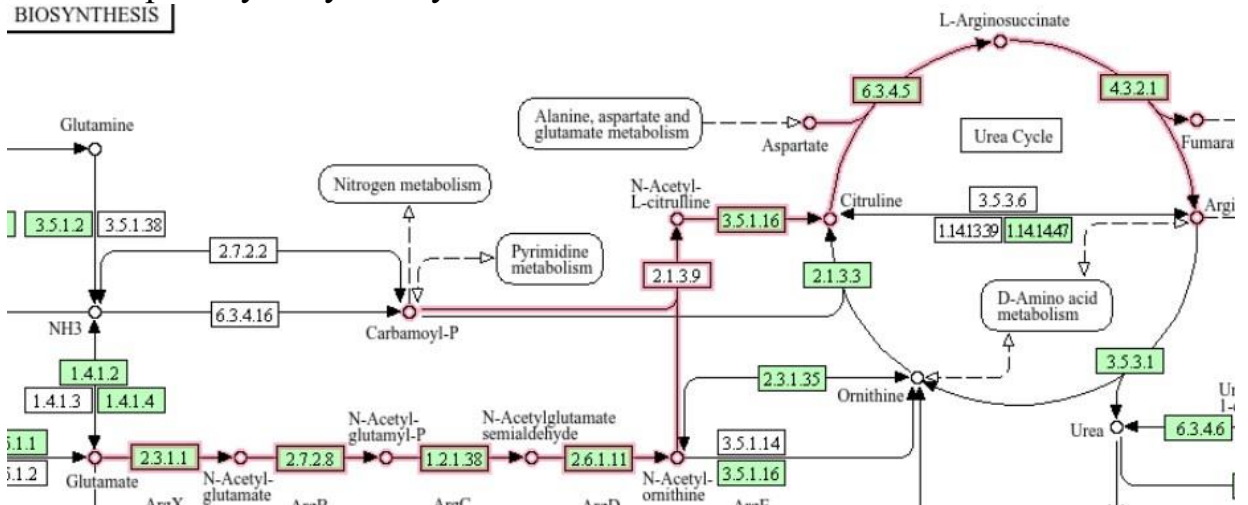


Варіант

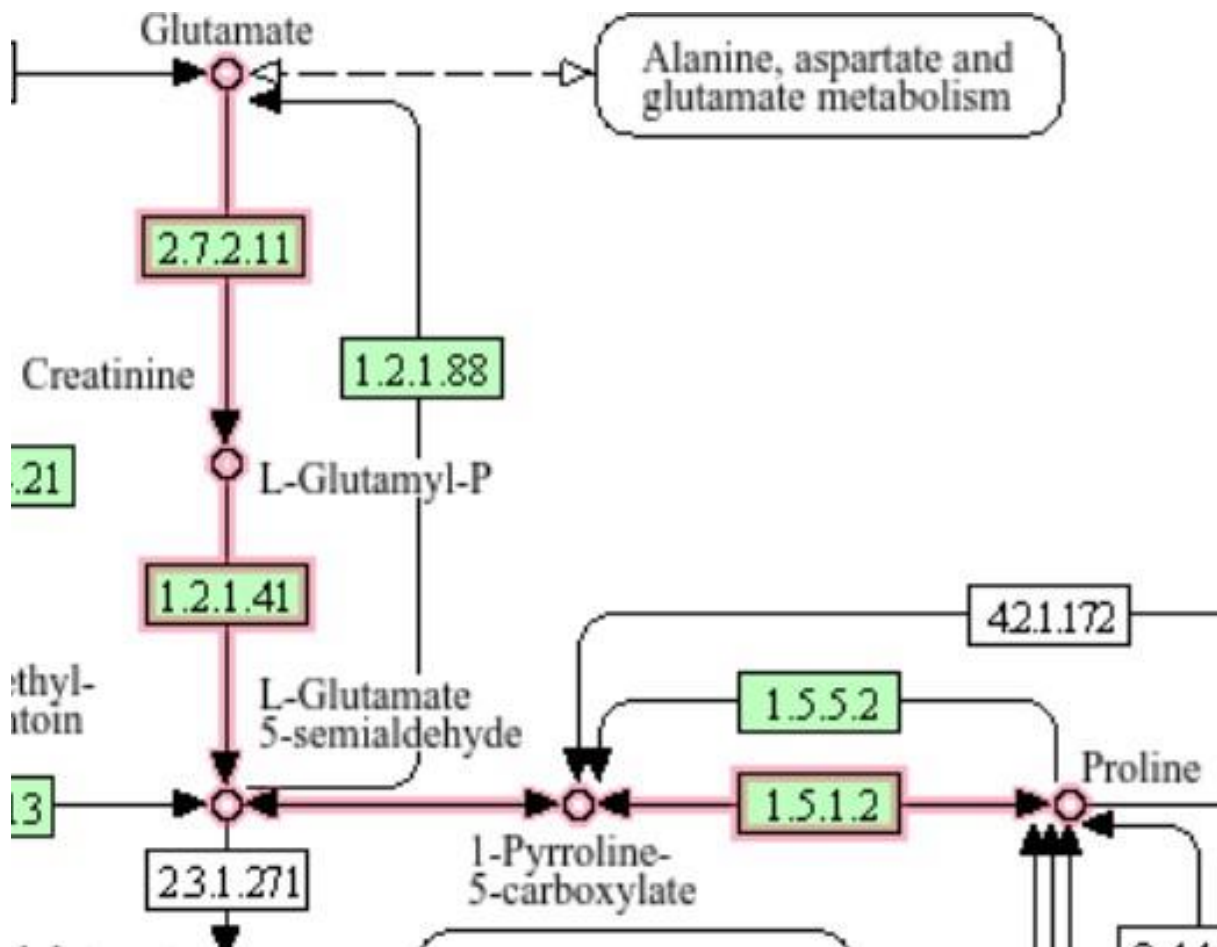
[Меню шляху | Завантажити | Довідка]

Синтез аргініну з глутамату.

BIOSYNTHESIS



Синтез проліну з глутамату.



Виділені амінокислоти що входять до складу ферменту колагенази в статті (ст

Table III: Amino Acid Composition of *Clostridium histolyticum* Collagenases^a

amino acid	α_1	α_2	β	γ_1	γ_2	δ	ϵ	ζ
Asp + Asn	90	91	156	98	101	131	144	160
Thr	42	42	80	57	57	60	68	73
Ser	37	37	67	46	47	59	69	72
Glu + Gln	59	60	98	69	70	95	104	115
Gly	56	55	92	60	60	61	73	99
Ala	38	38	66	47	47	43	46	57
Val	31	32	52	32	32	38	42	62
Met	3.7	3.7	8.0	4.9	4.9	9.6	12	15
Ile	32	31	50	31	30	38	38	56
Leu	51	51	72	51	50	68	69	87
Tyr	43	42	70	52	51	68	75	78
Phe	30	27	51	37	37	36	39	34
His	6.1	8.5	17	13	13	19	21	22
Lys	51	51	91	62	61	83	94	101
Arg	20	20	30	23	23	31	33	36
Pro	16	16	27	18	18	32	38	47
Cys ^b	2.2	2.2	3.5	2.4	2.5	4.1	4.5	4.5

^aExpressed as residues per molecule of enzyme. Trp was not

«ВИДЛІЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ»

(12) United States Patent Vaccaro et al.	(10) Patent No.: US 9,738,883 B2 (45) Date of Patent: Aug. 22, 2017
(54) PROCESS FOR THE PRODUCTION AND PURIFICATION OF THE COLLAGENASE ENZYME FROM VIBRIO ALGINOLYTICUS	FOREIGN PATENT DOCUMENTS EP 0 430 635 A1 6/1991
(71) Applicant: FIDIA FARMACEUTICI S.P.A. , Abano Terme (IT)	OTHER PUBLICATIONS
(72) Inventors: Susanna Vaccaro , Abano Terme (IT); Michele Caputo , Abano Terme (IT); Christian Cuppari , Abano Terme (IT); Giovanni Gennari , Abano Terme (IT)	Anonymous. Ion Exchange Chromatography Selection Guide; Pall (2015) downloaded from http://www.pall.com/main/laboratory/literature-library-details.p?id=38542 on Sep. 29, 2015.* Lecroisey et al., "Purification, Stability and Inhibition of the Collagenase From <i>Achromobacter Iophagus</i> ", FEBS Letters, Elsevier, Amsterdam, NL, vol. 59, No. 2, XP002981275, Nov. 1975, pp. 167-172 Takeuchi et al. "Structural gene and complete amino acid sequence of <i>Vibrio alginolyticus</i> collagenase", Biochem. J., vol. 281, XP055047105, 1992, pp. 703-708. Tong et al., "New <i>Achromobacter</i> collagenase and its immunological relationship with a vertebrate collagenase", Biochimica et Biophysica Acta, Elsevier, NL, vol. 955, No. 1, XP009165583, Nov. 19, 1987, pp. 43-49. Tong et al., "Purification and characterization of two high-molecular-mass forms of <i>Achromobacter</i> collagenase", Biochimica et Biophysica Acta, Elsevier, Amsterdam, NL, vol. 874, No. 3, XP025210494, Dec. 12, 1986, pp. 296-304.
(73) Assignee: FIDIA FARMACEUTICALS S.P.A. , Abano Terme (IT)	
(*) Notice: Subject to any disclaimer, the term of this patent is extended or adjusted under 35 U.S.C. 154(b) by 0 days.	* cited by examiner
(21) Appl. No.: 14/394,481	
(22) PCT Filed: Apr. 17, 2013	
(86) PCT No.: PCT/EP2013/057998	
§ 371 (c)(1), (2) Date: Oct. 15, 2014	

tissue, and in general in all experimental and therapeutic procedures requiring tissue dissociation.

The collagenase obtained by the process described below is characterised by:

- molecular weight 82 Kda;
 - specific activity between 1000 and 1800 nkat/mg;
 - purity between 98.0 and 100%;
 - absence of microbial and protein contaminants, specifically absence of endotoxins and DNA;
 - stability at a pH of between 5.5 and 11;
 - stability in aqueous solution at a T ranging between 4° and 40° C., particularly stable at 37° C.;
 - stability in aqueous solution at 4° C. for 30 days;
 - stability in aqueous solution at a T ranging between -20° C. and -80° C. for 24-48 months;
 - lyophilisability to obtain a stable freeze-dried powder.
- It is preferably also characterised by
- N-terminal sequence: H₂N-Thr-Ala-Cys-Asp-Leu-Glu-Ala-Leu-Val-Thr-Glu-Ser-Ser-Asn-Gln (SEQ ID NO:3);
 - inhibition by Ag and Cu salts and the chelating agent EDTA;
 - storability at temperatures ranging between -20 and -80° C., i.e. in frozen form, without significant loss of enzyme activity (5-15%).

The collagenase production and purification process according to the invention comprises the following stages:

Stage A: Inoculation of *Vibrio alginolyticus* chemovar. *iophagus* into an Erlenmeyer flask and fermentation with culture broth of non-bovine animal origin;

Stage B: Clarification of the fermented broth thus obtained by tangential flow ultrafiltration (TFF1) with 100-500 kD Molecular Weight Cut-Off (MWCO) cassettes, preferably 300 kD;

Stage C: Dialysis and concentration of the clarified medium obtained in stage B, by tangential flow ultrafiltration (TFF2) with 5-30 kD MWCO cassettes, preferably 10 kD MWCO;

Stage D: Purification of the solution containing collagenase obtained in Stage C, by anion-exchange resin carrying weak basic groups, at a pH of between 6.9 and 7.4, preferably at a pH of 7.1;

Stage E: Dialysis and concentration of the fractions collected which have collagenolytic activity, originating from Stage D, by tangential flow ultrafiltration (TFF3) with 10-50 kD MWCO cassettes, preferably 30 kD MWCO;

Stage F: Purification of the solution thus obtained, by anion-exchange resin carrying strong basic groups, at a pH of between 6.9 and 7.4, preferably at a pH of 7.1;

Stage G: Diafiltration and concentration of the fractions with collagenolytic activity ≥95% originating from stage F, by tangential flow ultrafiltration (TFF4) with 10-50 kD MWCO cassettes, preferably 30 kD MWCO.

600 nm (OD_{600nm}) reaches a value of between 1 and 4, the inoculum is ready for transfer to the fermenter.

The medium used for fermentation is the same as used to prepare the inoculum, with the addition of a small amount of antifoam to prevent foam formation due to aeration and stirring.

One fermentation lasts for 14-20 hours, normally 16 hours. During fermentation, samples are taken by a sterile procedure to check the purity, OD_{600nm}, enzyme activity and pH.

When the enzyme activity is ≥25,000 nkat/liter, fermentation is terminated and CaCl₂ is added to stabilise the enzyme. The temperature is reduced to approx. 8° C., and the mixture is left under stirring.

The following control tests are performed on the solution obtained at stage A: OD_{600nm}; pH; enzyme activity; protein concentration; SDS-PAGE.

The fermentation broth originating from stage A presents, in addition to the collagenase of interest, other proteases produced by the bacterium during fermentation (mainly serine protease), protein aggregates with high molecular weight and residues of the medium.

Stage B: the fermented broth originating from stage A is clarified by tangential flow ultrafiltration (TFF1) with 100-500 kD MWCO cassettes, preferably 300 kD; this eliminates the microbial cells and protein aggregates with high molecular weight.

The following control tests are performed on the solution obtained at stage B: pH; enzyme activity; protein concentration; SDS-PAGE; caseinase assay.

Stage C: the clarified medium originating from stage B is concentrated and dialysed by ultrafiltration with 5-30 kD MWCO cassettes, preferably 10 kD MWCO, approx. 15-25 times. The solution obtained at stage C typically presents enzyme activity of 500-700 nkat/ml, and is stable for 12 months at -20° C. The purpose of tangential flow filtration with 5-30 kD MWCO cassettes is to considerably reduce the volume and replace the culture medium with the 25 mM TRIS-HCl, 10 mM CaCl₂, pH 7.1 buffer, which stabilises the collagenase and is suitable for the subsequent purification process.

The following control tests are performed on the solution obtained at stage C: pH; enzyme activity; protein concentration; SDS-PAGE.

Stage D: the solution containing the collagenase deriving from stage C undergoes the first chromatographic purification with anion-exchange resin carrying diethylaminoalkyl groups, preferably diethylaminoethyl, such as DE-52 (diethylaminoethyl cellulose DEAE Whatman). These resins carry weak basic groups and therefore have a degree of ionisation dependent on the pH, with a narrow range of pHs between 6.9 and 7.4, preferably 7.1.

The solution containing the collagenase deriving from stage C is then loaded into a column (Pall Chromatography

Stage H: Filtration of the solution containing collagenase thus obtained, through an 0.2 µm absolute filter, and storage at a temperature of between -20° and -80° C.

Tests with the materials and methods described in the "Test Methods" paragraph below are conducted at the end of each stage.

Stage A: is a batch fermentation process; the inoculum is prepared in an Erlenmeyer flask containing a culture broth formed by a peptone of non-bovine animal origin, such as porcine origin, or a mixture of peptones of non-bovine animal and plant origin, NaCl, CaCl₂ and TRIS (tris-hydroxymethyl-aminomethane), at a pH of between 6.9 and 7.4, preferably 7.1. When the optical density measured at

Column Resolute Mod. 400-V-EP7040) packed with DE-52 resin. The chromatography runs are monitored by a UV-vis detector at 280 nm.

Before the column is loaded it is equilibrated with the same buffer, hereinafter called "equilibration buffer" (25 mM TRIS-HCl, 10 mM CaCl₂, pH 7.1), in which the collagenase was dialysed during stage C.

After loading, the resin with the bonded collagenase is eluted with said equilibration buffer, to eliminate the proteins not bonded to the resin. A second wash with a buffer with greater conductivity, hereinafter called "washing buffer" (300 mM TRIS-HCl and 10 mM CaCl₂ at pH 7.1), is performed to eliminate impurities with low molecular

US 9,738,883 B2

7

weight. The collagenase bonded to the resin is eluted by further increasing the conductivity with a third buffer called the "elution buffer" (300 mM TRIS-HCl, 700 mM NaCl and 10 mM CaCl₂ at pH 7.1).

Stage E: the fractions collected during elution which present collagenolytic activity and exhibit good purity in SDS-PAGE are combined and transferred to the ultrafiltration system with 10-50 kD MWCO cassettes, preferably 30 kD, to be concentrated and dialysed in a buffer that stabilises the collagenase and is suitable for the subsequent purification process.

The following control tests are performed on the solution obtained at Stage E: pH; enzyme activity; protein concentration; SDS-PAGE; caseinase assay.

Stage F: the solution originating from Stage E passes to the second purification stage with anion-exchange chromatography using a resin carrying strong basic exchanger groups formed by quaternary ammonium, such as Source™ 15Q (GE Healthcare). The chromatography runs are monitored by a UV-vis detector at 280 nm.

Before loading, the column (Millipore GS 70-550) packed with Source™ 15Q resin is equilibrated with the same buffer in which the collagenase was dialysed during stage E (equilibration buffer).

The solution containing the collagenase originating from stage E is loaded into the column, and the resin with the bonded collagenase is eluted with the equilibration buffer to eliminate the unbonded proteins. The collagenase bonded to the resin is eluted by further increasing the conductivity with a second buffer (elution buffer 2-300 mM TRIS-HCl and 10 mM CaCl₂ at pH 7.1).

Stage G: the fractions collected during elution which present collagenolytic activity and exhibit a purity of ≥95% in SDS-PAGE are combined and transferred to the ultrafiltration system with 10-50 kD MWCO cassettes, preferably 30 kD, to be concentrated and dialysed in a buffer that stabilises the collagenase.

The following control tests are performed on the solution obtained at Stage G: pH; enzyme activity; protein concentration; SDS-PAGE.

Stage H: the collagenase solution originating from stage

8

propyl-D-arginine (where PZ=4-phenylazobenzyloxycarbonyl) specific for collagenase. After reacting with collagenase the synthetic substrate is cleaved into 2 fragments, PZ-L-prolyl-L-leucyl and glycy-L-prolyl-D-arginine. The second fragment is colourless, while the first is a chromophore and can be determined spectrophotometrically after extraction with an organic solution of ethyl acetate acidified with citric acid. The absorbance of the fragment at 320 nm is proportional to the enzyme activity.

To perform the enzymatic assay it is necessary to prepare a series of dilutions of the sample so as to have an enzymatic concentration that falls into the linearity range of the method.

The sample to be analysed is diluted in 25 mM Tris, 10 mM CaCl₂, pH 7.1 buffer; 0.5 ml of this buffered solution is reacted at 37° C. for 15 min with 2 ml of a 1.23 mM solution of synthetic substrate. At the end of the enzymatic reaction, 0.5 ml of the reaction mixture is extracted with organic phase with a mixture of 5:1 ethyl acetate and 0.5% citric acid, pH 3.5. The organic phase is removed and dehydrated by adding 300 mg of anhydrous sodium sulphate. The dehydrated organic phase is analysed spectrophotometrically at 320 nm against ethyl acetate. The results of the enzyme activity, expressed in nkat/ml, are calculated with the following formula:

Activity nkat/ml =

$$\frac{(\text{sample } Abs_{320} - \text{blank } Abs_{320}) \times \text{Std. Conc. } (\mu\text{moles/ml})}{\text{Std. } Abs_{320} - \text{blank } Abs_{320}} \times \frac{50 \times 1000}{900} \times fd$$

1000=conversion factor from µmol to nmol

900=seconds in 15 minutes

fd=conversion factor for the initial dilution of the collagenase solution

50=conversion factor for dilution of the sample (0.5 ml