

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

О. О. Кравченко
О. М. Савчук
Л. І. Остапченко

ОСНОВИ БІОТЕХНОЛОГІЇ

Навчальний посібник



УДК 60:577.15(075.8)
К78

Рецензенти:

д-р біол. наук, проф., академік НАН України Я. Б. Блюм
(Інститут харчової технології та геноміки Національної академії наук України),
д-р тех. наук, проф. О. Р. Мокроусова
(Київський національний університет технології та дизайну)

*Рекомендовано до друку вченою радою ННЦ "Інститут біології та медицини"
Київського національного університету імені Тараса Шевченка
(протокол № 6 від 11 грудня 2018 року)*

*Ухвалено науково-методичною радою
Київського національного університету імені Тараса Шевченка
(протокол № _____ від року)*

Кравченко О. О., Савчук О. М., Остапченко Л. І.

К78 Загальна біотехнологія : навчальний посібник /
О. О. Кравченко, О. М. Савчук, Л. І. Остапченко. – К.: ВПЦ
"Київський університет", 2019. – 269 с.

ISBN

На сучасному, науково обґрунтованому рівні висвітлено основні засади біотехнологічних процесів. Розглянуто особливості продуктів і продуцентів у біотехнології, велику увагу приділено методам, що застосовують для виділення, очищення й формуляції продуктів. Досконало описано особливості організації біотехнологічного виробництва і підходи до стандартизації та контролю якості. Із застосуванням фундаментальних основ викладено роль і особливості використання ензимів у виробництві.

Для студентів біологічних, біотехнологічних, хіміко-технологічних і фармацевтичних спеціальностей вищих навчальних закладів.

УДК 60:577.15(075.8)

ISBN

© Кравченко О. О., Савчук О. М., Остапченко Л. І., 2019
© Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
ВПЦ "Київський університет", 2019

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ	4
ВСТУП	5
ГЛАВА 1. СУЧАСНІСТЬ ТА ЕТАПИ СТАНОВЛЕННЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ	10
ГЛАВА 2. СИРОВИНА ДЛЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ВИРОБНИЦТВА	24
2.1. Отримання та значення рекомбінантних білків і пептидів	24
2.2. Продуценти рекомбінантних білків	30
2.3. Натуральна сировина в біотехнології	50
ГЛАВА 3. ХАРАКТЕРИСТИКА СКЛАДОВИХ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ	56
.....	3
1. Узагальнення етапів біотехнологічних процесів. Біооб'єкти. Апаратура	56
3.2. Методи отримання, очищення та формуляції цільового продукту	77
3.3. Критерії оцінювання ефективності біотехнологічних процесів (на прикладі оцінювання ефективності ферментації)	117
3.4. Контроль і керування біотехнологічними процесами, моделювання та оптимізація	126
3.5. Експериментальні роботи з оптимізації процесу очищення цільового біотехнологічного продукту	131
3.6. Пілотні заводи. Поетапна та послідовна розробка технології	137
ГЛАВА 4. СИСТЕМА СТАНДАРТИЗАЦІЇ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ВИРОБНИЦТВ	154
4.1. Система стандартизації виробництв і контролю якості на прикладі лікарських засобів	154
4.2. Кваліфікація і валідація	161
4.3. Стандартні операційні процедури (СОП)	169
ГЛАВА 5. БІОКАТАЛІЗ У БІОТЕХНОЛОГІЇ	174
5.1. Ключові поняття про ферменти як біологічні каталізатори	174
5.2. Механізми та регуляція перебігу ферментативних реакцій	195
5.3. Інженерна ензимологія	223
5.4. Імобілізовані ферменти як інструмент біотехнології	233
ЛІТЕРАТУРА	254

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ

АСК	автоматизована система керування
БАД	біологічно активна домішка
ДГФР	дигідрофолатредуктаза
ЗРБ	загальний розчинний білок
НК	нуклеїнова кислота
ЛДГ	лактатдегідрогеназа
ПЗ	пілотний завод
РЦП	розчинений цільовий продукт
СОП	стандартні операційні процедури
ХРП	хроматографія, що поділяє за розміром
СНО	<i>Chinese hamster ovary cell culture</i> (культура клітин яєчника китайського хом'яка)
DCR	<i>dominant control region</i> (домінантна регуляторна ділянка)
DM	подвійна міні-хромосома
EMA	<i>European Medicines Agency</i> (Європейське агентство з оцінювання лікарських препаратів)
FDA	<i>U. S. Food and Drug Administration</i> (Управління із санітарного нагляду за якістю харчових продуктів та медикаментів)
DSP	<i>downstream processing</i> (етап після накопичення цільового продукту)
GCP	<i>Good Clinical Practice</i> (належна клінічна практика)
GLP	<i>Good Laboratory Practice</i> (належна лабораторна практика)
GMP	<i>Good Manufacturing Practice</i> (належна виробнича практика)
GRAS	<i>generally recognized as safe</i> (група організмів, переважно безпечних)
R&D	<i>research and development</i> (дослідження та розробки)
USP	<i>upstream processing</i> (етап накопичення цільового продукту)

ВСТУП

Середина 60-х рр. ХХ ст. ознаменувалась численними передбаченнями виникнення "нової біології", розвиток прикладних галузей якої істотно змінив би процедури отримання багатьох хімічних, фармацевтичних і харчових продуктів. Така "революція" стала реальністю завдяки цілій низці відкриттів наступного десятиліття в галузі біохімії, клітинної, мікро- та молекулярної біології, вірусології, цитології тощо. Сміливі надії були зумовлені, у першу чергу, з'ясуванням структури та функції певних ферментів, їх практичним використанням в іммобілізованій формі – насамперед мікробіологами та ензимологами – у різноманітних виробничих процесах, а також тим, що фахівці в галузі молекулярної генетики здійснили перебудову ДНК із наступним ефективним перенесенням її від одних організмів до інших. Завдяки стрімкому прогресу вірусології (дослідження бактеріофагів), мікробіології (поглиблене вивчення фізіології, генетики та молекулярної біології кишкової палички (*Escherichia coli*), а також вивчення плазмід), молекулярної генетики (установлення генетичного коду) та ензимології (відкриття ферментів рестрикції) були накопичені певні знання та розроблено цілий арсенал методів генної інженерії; при цьому були гідно оцінені й потенційні можливості таких методів.

За класичним означенням біотехнологія – це, по суті, не що інше, як використання культур клітин бактерій, дріжджів, тварин або рослин, метаболізм і біосинтетичні можливості яких забезпечують вироблення специфічних речовин. Відповідно до

визначення Європейської біотехнологічної федерації, створеної у 1978 р., біотехнологія на основі застосування знань і методів біохімії, молекулярної біології, мікробіології, генетики й застосування хімічної техніки дозволяє отримувати вигоду в технологічних процесах, що використовують властивості мікро-, макроорганізмів і культур клітин. Вона створює можливості для одержання за допомогою легкодоступних і відновлюваних ресурсів тих речовин і сполук, які є важливими для життя й добробуту людей.

Поняття *біотехнологія* нині має багато означень:

1) використання біологічних об'єктів, систем або процесів для виробництва необхідних продуктів або потреб сервісної індустрії;

2) комплексне застосування біохімічних, мікробіологічних та інженерних знань з метою промислового використання потенційних можливостей мікроорганізмів, культур клітин та їхніх окремих компонентів або систем;

3) технологічне використання біологічних явищ для відтворення й одержання (виробництва) різних типів корисних продуктів;

4) застосування наукових та інженерних принципів для обробки матеріалів біологічними агентами з метою одержання необхідних продуктів або створення сервісних технологій.

Біотехнологія насправді є не чим іншим, як сукупністю технічних прийомів (підходів) і процесів, заснованих на використанні біологічних об'єктів. Термін *біотехнологія* включає три складові: "*біос*", "*техне*" та "*логос*" (від грец. "*біос*" – життя; "*техне*" – мистецтво, майстерність, уміння; "*логос*" – поняття, учення). Отже, як впливає з наведених означень, біотехнологія, по суті, зводиться до використання мікроорганізмів, тваринних і рослинних клітин або ж їхніх ферментів для синтезу, руйнування або трансформації

(перетворення) різноманітних матеріалів з метою одержання корисних продуктів для потреб людини.

У промисловому масштабі біотехнологія – це біоіндустрія. Остання включає, з одного боку, галузі, у яких біотехнологічні методи можуть з успіхом замінити (доповнити) уже існуючі традиційні методи, з іншого боку – галузі, у яких біотехнологія відіграє провідну роль.

Серед пріоритетів у галузі хімічної промисловості – синтез штучних приправ, полімерів, сировини для текстильної промисловості; у галузі енергетики – одержання біопалива (метанолу, етанолу), біогазу та водню; у галузі біометалургії – видобуток деяких металів.

Іншими напрямками біотехнології є: виробництво продовольства (широкомасштабне вирощування дріжджів, водоростей і бактерій для одержання білків, амінокислот, вітамінів, ферментів; продукти гібридної технології); збільшення продуктивності сільського господарства (клонування та селекція сортів рослин, виходячи із тканинних і клітинних культур, виробництво біоінсектицидів); мікробіологічна промисловість (розробка і виробництво вакцин, діагностичних препаратів, синтез гормонів, інтерферонів і антибіотиків); захист навколишнього середовища та зменшення його забруднення (очищення стічних вод, переробка господарських відходів, виготовлення компосту, а також виробництво сполук, що піддаються розщепленню мікроорганізмами).

Метою біотехнології є створення і практичне впровадження (тобто практичне використання):

- нових біологічно активних речовин і лікарських препаратів, що використовуються в охороні здоров'я для діагностики, профілактики та лікування різних захворювань;

- біологічних засобів захисту сільськогосподарських рослин від збудників захворювань і шкідників; бактеріальних добрив і регуляторів росту рослин і тварин; нових сортів рослин, стійких до різного роду несприятливих чинників (факторів навколишнього середовища); нових порід тварин з корисними властивостями (трансгенні тварини);
- цінних кормових домішок для підвищення продуктивності сільськогосподарських тварин (кормового білка, амінокислот, вітамінів, ферментів, що сприяють підвищенню засвоюваності кормів тощо);
- нових біоінженерних методів для одержання вискоєфективних препаратів різного призначення, що використовуються в сільському господарстві та ветеринарії;
- нових технологій створення й одержання господарчо-цінних продуктів для харчової, хімічної й мікробіологічної промисловості;
- ефективних технологій переробки сільськогосподарських, промислових і побутових відходів для одержання продуктів, які можуть бути використані в інших галузях господарської діяльності людини (біогаз, добрива, паливо для автомобілів тощо).

Біотехнології можна умовно поділити на три категорії відповідно до особливостей продуктів, які можна одержати:

- природні біотехнологічні продукти (лактат, гліцерин, етанол тощо);
- біотехнологічні продукти другого покоління, отримані за допомогою генно-інженерних штамів (наприклад людський інсулін);
- біотехнологічні продукти третього покоління – продукція ХХІ ст., заснована на вивченні взаємодії біологічно активних речовин і рецепторів клітин та створенні

принципово нових препаратів. Прикладом таких препаратів можуть бути антисмислові нуклеїнові кислоти. У клітині людини приблизно 20 тис. генів. Використовуючи принцип комплементарності, можна створити ланцюг нуклеїнової кислоти, здатний "вимикати" цільовий ген, що дозволяє за допомогою антисмислових нуклеїнових кислот керувати генами, корегуючи таким чином метаболізм.

Зрозуміло, що такі комплексні завдання потребують інтеграції різних напрямів наукових і технічних знань і характеризують біотехнологію як низку перспективних технологій, що можуть застосовуватися в найрізноманітніших галузях індустрії. Інтеграція біології, хімії та інженерних підходів у біотехнології здійснюється таким чином, щоб забезпечити максимально ефективне використання потенційних можливостей усіх залучених сфер знань. Однак, незважаючи на комплексність біотехнології, її не слід розглядати як єдине ціле, на зразок мікроелектроніки. Скоріше її потрібно розглядати як низку перспективних технологій, поєднання яких буде постійно варіювати залежно від конкретних практичних завдань.

Пропонований навчальний посібник призначений для формування у студентів базового комплексу знань із основ методології біотехнологічних процесів, принципів їх застосування на практиці для розв'язання фахових завдань і поглибленого аналізу особливостей організації, управління виробництвом на основі біологічних систем, що і є метою вивчення зазначеної навчальної дисципліни. Посібник містить теоретичний матеріал, зрозумілі приклади, запитання для самоконтролю після кожного розділу та список рекомендованої літератури. Він надає вичерпну інформацію про технологію й обладнання біотехнологічних підприємств, включає розділи, присвячені властивостям різних типів сировини в біотехнології,

характеристикам технології й обладнання переробки продукції. У посібнику описано пристрої, що застосовуються в біотехнологічних процесах, і принципи їх функціонування, наведено характеристики продуктивності, основні формули її розрахунку та оцінки ефективності процесу виробництва, правила оптимізації та контролю якості; узагальнено й систематизовано теоретичні надбання у сфері стандартизації біотехнологічного виробництва.

При написанні посібника автори керувались Стандартами вищої освіти України за спеціальністю 162 "Біотехнології та біоінженерія" для першого (бакалаврського) і магістерського рівнів вищої освіти, що затверджені й уведені в дію наказом Міністерства освіти і науки, а також навчальними програмами кафедри біохімії ННЦ "Інститут біології та медицини" з дисциплін "Основи біотехнології" та "Біотехнологія". При його підготовці автори послуговувались також багаторічним досвідом викладання вищезазначених дисциплін в Київському національному університеті імені Тараса Шевченка.

Автори щиро вдячні всім колегам, що допомагали в підготовці книги, особливо рецензентам академіку НАН України Я. Б. Блюму та професору О. Р. Мокроусовій, доброзичлива та професійна критика яких сприяла поліпшенню посібника, а також співробітникам кафедри біохімії Київського національного університету імені Тараса Шевченка, зокрема Л. П. Савінайнен, зусиллями якої оформлено рисунки.

Глава 1

СУЧАСНІСТЬ ТА ЕТАПИ СТАНОВЛЕННЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ

Практичні успіхи біотехнології тісно пов'язані з фундаментальними дослідженнями. У цьому аспекті не можна не зазначити певну наукову багатогранність біотехнології: її розвиток залежить від комплексу знань не лише наук біологічного профілю, а й багатьох інших (рис. 1.1).

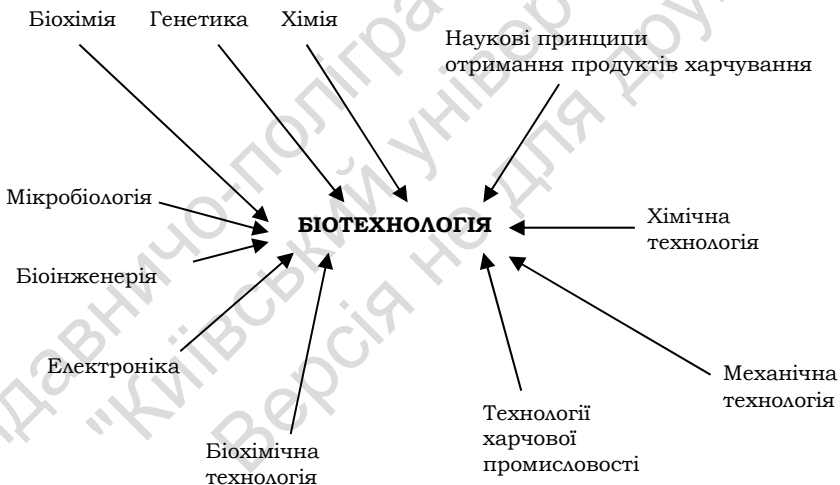


Рис. 1.1. Основні галузі, пов'язані з біотехнологією

Сьогодні біотехнологія стрімко перемістилась на передові позиції науково-технічного прогресу. Фундаментальні дослідження життєвих процесів на клітинному й молекулярному рівнях зумовили появу принципово нових технологій і нових

продуктів. Традиційні біотехнологічні процеси, засновані на бродінні, доповнюються новими ефективними процесами отримання білків, амінокислот, антибіотиків, ферментів, вітамінів, органічних кислот тощо. Настала ера новітньої біотехнології, пов'язана з одержанням вакцин, гормонів, інтерферонів тощо за допомогою неприродних, штучно створених продуцентів. Одним з найважливіших завдань біотехнології сьогодення є: підвищення продуктивності сільськогосподарських рослинних культур і тварин, створення нових порід видів, що культивуються в сільському господарстві, захист навколишнього середовища й утилізація відходів, створення нових екологічно чистих процесів перетворення енергії й одержання мінеральних ресурсів. У сучасній біотехнології відповідно до специфіки сфер її застосування доцільно виділити такі самостійні розділи:

- промислова біотехнологія;
- медична біотехнологія;
- технологічна біоенергетика,
- сільськогосподарська біотехнологія;
- біогідрометалургія;
- інженерна ензимологія;
- клітинна і генетична інженерія;
- екологічна біотехнологія.

Перспективність і ефективність застосування біотехнологічних процесів у різних сферах людської діяльності, від одержання їжі та напоїв до відтворення екологічно чистих енергоносіїв і нових матеріалів, зумовлена їх відносною компактністю й одночасно великомасштабністю, високим рівнем механізації та продуктивності праці. Такі процеси значною мірою піддаються контролю, регуляції та автоматизації. Вони, на відміну від хімічних, реалізуються в "м'яких" умовах, за нормального тиску, нейтрального середовища і невисоких температур; меншою мірою забруднюють навколишнє середовище відходами й побічними продуктами, мало залежать від кліматичних і погодних умов, не

потребують значних земельних ділянок, застосування пестицидів, гербіцидів та інших, чужорідних для навколишнього середовища, агентів. Тому біотехнологія загалом та її окремі розділи належать до найпріоритетніших напрямів науково-технічного прогресу, що є яскравим прикладом високих технологій, з якими пов'язують перспективи розвитку багатьох виробництв. Біологічні технології сьогодні перебувають у фазі бурхливого розвитку, рівень якого суттєво визначається науково-технічним потенціалом країни. Усі високорозвинені країни відносять біотехнологію до найпріоритетніших галузей сучасності, вважаючи її ключовим засобом реконструкції та оптимізації промисловості відповідно до викликів часу, а тому вживають заходи, спрямовані на стимулювання її розвитку.

Біотехнологічні процеси надзвичайно різноманітні за історичним походженням і структурою. Вони поєднують елементи фундаментальних наук, а також деяких прикладних галузей, таких як хімічна технологія, машинобудування, економіка. Наукова багатогранність біотехнології загалом і тих її розділів, що мають за мету розв'язання природоохоронних завдань, дивовижна: вони використовують досягнення наук біологічного циклу, що вивчають надорганізменний рівень (екологія), біологічні організми (мікробіологія, мікологія), суборганізменні структури (молекулярна біологія, генетика). На біотехнологію впливають також досягнення хімії, фізики, математики, кібернетики, механіки. Крім того, сучасні біотехнології гостро потребують науково обґрунтованого опрацювання технології та належного апаратного оформлення. Тому необхідним є органічний зв'язок з технічними науками – машинобудуванням, електронікою та автоматизацією. Суспільні й економічні науки також відіграють значну роль у розвитку екологічної біотехнології, оскільки практичні завдання, які вона розв'язує, мають велике соціально-економічне значення для розвитку будь-якого суспільства. До біотехнології, як ні до однієї іншої галузі чи сфери наукових інтересів, можна застосувати відомі слова Луї Пастера про те,

що жодна наука не належить до прикладних, при цьому є наука і сфери її застосування, і вони пов'язані одна з одною, як плід з деревом, що його виростило.

Еволюцію біотехнології неможливо відділити від розвитку знань про основні засади життєдіяльності. У 1953 р. Сенгер з'ясував повну послідовність білка інсуліну, а Уотсон і Крік довели, що дезоксирибонуклеїнова кислота (ДНК) побудована з двох ланцюгів. У 1963 р. Ніренберг розшифрував генетичний код, який виявився універсальним як для бактерій, так і для вищих організмів, включаючи людину, після чого генетична інформація та її зміст, тобто взаємозв'язок між генетичним кодом і структурою білків, стали загальнодоступними для вивчення. Найважливіший етап припадає на 60-ті рр. ХХ ст., коли з'явилася можливість автоматизувати процес визначення структури білків. Було з'ясовано послідовності (первинні структури) значної кількості білків, з яких склали "Атлас білків", що зберігається в комп'ютерних системах.

Крім вивчення білків, суттєві успіхи були досягнуті в дослідженнях нуклеїнових кислот. У 1976 р. Гілберт і Максам у Гарвардському університеті розробили швидкий метод хімічного аналізу ДНК; з'явилася можливість визначати послідовність нуклеотидів. У 1982-85 рр. було створено прилад для автоматичного аналізу послідовностей нуклеїнових кислот. Аналіз ДНК дозволив детектувати, ґрунтуючись на генетичному коді, відповідні амінокислотні послідовності білків, синтез яких перебуває під контролем певних генів. Наступний визначальний етап – це синтез біополімерів відповідно до встановленої послідовності. Перші комерційні прилади, що дозволили здійснити автоматизований синтез поліпептидів, були розроблені на основі досліджень Роберта Мерріфілда у 1963 р. Після визначення структури фенілаланінової транспортної РНК (тРНК) Хар Корана (спочатку у Вісконсинському університеті, а потім у Массачусетському технологічному інституті у 1970-72 рр.) здійснив синтез ДНК (інакше кажучи, гена), що відповідає за синтез цієї тРНК. Згодом Корана і його співробітники

синтезували ген попередника тирозинової тРНК *Escherichia coli*. Артур Ріггз та Кейті Ітакура зі співавторами в Національному медичному центрі "Сіті ов Хоуп" (Дуарте, Каліфорнія) у 1977 р. з успіхом отримали ген соматостатину, а в 1979 р. – ген інсуліну людини. Ці гени були введені в клітини бактерії *Escherichia coli* з використанням методів генної інженерії. Так уперше була продемонстрована експресія гена людини бактеріальними клітинами.

Створено автоматичні синтезатори, що дозволили проводити більш-менш автоматизоване нарощування нуклеотидного ланцюга, пов'язаного з носієм. Уся процедура загалом контролювалась комп'ютером (тобто програмою, що передбачає зберігання, дозування, перекачування, внесення в реакційну камеру, відмивання розчинників і реагентів, а також контроль запрограмованої послідовності операцій). У 1980 р. К. Ітакура створив перший хімічний синтезатор генів. Синтез фрагментів нуклеїнових кислот, який у 1981 р. здійснювали шляхом прирощування нуклеотидів один до одного, був швидко вдосконалений за рахунок з'єднання заздалегідь отриманих довших послідовностей відповідно до заданої програми. Хімічний синтез ДНК, яка містить специфічну послідовність нуклеотидів, відрізняється від реплікації ДНК *in vivo* чи *in vitro* ДНК-полімеразою. Остання потребує матриці, молекули ДНК, що містить точно відтворювану інформацію, але не є джерелом нової інформації. При хімічному ж синтезі з'являється можливість вносити зміни в послідовність нуклеотидів і вивчати їх вплив на біологічну функцію синтезованої таким способом молекули ДНК (або РНК). Хімічний синтез дає можливість вивчати регуляцію синтезу нуклеїнових кислот (транскрипції, реплікації) і білків (трансляції, фолдингу). У процесі транскрипції вирішальна роль належить певним нуклеотидним послідовностям, які називаються *промоторами*. Уводячи різні нуклеотиди в послідовність під час хімічного синтезу, тобто фактично одержуючи точкові мутації, можна простежити за змінами функції такої послідовності в клітині. Саме таким чином у лабораторії Університету Луї Пастера у Страсбурзі у

промоторній ділянці гена, що кодує один з поліпептидів білка курячого яйця, був замінений одиничний нуклеотид. Ця мутація дозволила встановити роль специфічної нуклеотидної послідовності в регуляції синтезу інформаційної РНК. Отримані в результаті хімічного синтезу полінуклеотиди можуть бути використані для виділення за допомогою гібридизації відповідної інформаційної РНК, яка кодує білки.

Стрімкий прогрес біології, яскравим виявом якого є бурхливий розвиток біотехнології, тісно пов'язаний з удосконаленням аналітичних методів (необхідність у яких виникла у зв'язку з розвитком мікробіології та вірусології), таких як ультрацентрифугування, включення в молекули радіоактивних ізотопів, електрофорез, хроматографічне розділення макромолекул (наприклад афінна хроматографія розділення складних молекул з використанням відповідних моноклональних антитіл), двовимірний електрофорез (який дозволяє аналізувати до 5 000 білків у одній клітині) і методи мікроаналізу (визначення первинної структури білка виходячи лише з 10 нг, а також структури інших біологічних макромолекул, таких як полісахариди, зв'язані з білками, у складі глікопротеїнів).

Отже, якщо розвиток біологічних знань, принаймні частково, можна вважати результатом технічного прогресу, то сьогодні біологічна наука, збагачена досягненнями ензимології, мікробіології, вірусології, молекулярної біології, здатна створити систему взаємопов'язаних галузей біотехнології, що мають унікальну властивість: вони ґрунтуються на функціонуванні природних (а не штучних) систем, метаболічні механізми яких працюють на користь людству.

Біотехнологія – міждисциплінарний напрям науково-технічного прогресу, що виник на стику біологічних, хімічних і технічних знань і покликаний створити нові біотехнологічні процеси, які в більшості випадків будуть перебігати за низьких температур, потребувати меншої кількості енергії та базуватися переважно на дешевих субстратах, що використовуватимуться як первинна сировина. Однак варто усвідомлювати, що біотехнологія не є чимось новим, раніше невідомим, – вона

лише розвиток і розширення набору технологічних підходів, які з'явилися тисячі років тому.

Біотехнологія включає багато традиційних процесів, давно відомих і широко використовуваних людиною. Зокрема, це – пивоваріння, хлібопечення, виробництво вина, сиру, приготування багатьох східних пряних соусів, а також різноманітні способи утилізації відходів. У всіх перерахованих процесах використовувалися біологічні об'єкти (нехай навіть без достатніх знань) і всі ці процеси впродовж багатьох років удосконалювалися, щоправда емпірично. Отже, первинний етап біотехнології розпочався в глибині століть і тривав приблизно до кінця XIX ст.

Роботи великого французького вченого Луї Пастера (1822–1895) заклали фундамент практичного використання досягнень мікробіології та біохімії в традиційних біотехнологіях (пивоваріння, виноробство, виробництво оцту) та ознаменували початок нового, наукового періоду розвитку біотехнології. Для цього періоду характерним є розвиток промислової біотехнології, особливо ферментаційних процесів з використанням мікроорганізмів у промислових масштабах. Було розроблено стерильне виробництво шляхом ферментації ацетону, гліцерину; інтенсивно вивчаються основні групи мікроорганізмів, здатних до різних типів бродіння, досліджуються біохімічні особливості цих процесів. Після відкриття Олександром Флемінгом пеніциліну (1929) були розроблені процеси і прилади для глибинного культивування продуцентів, що значно знизило собівартість виробництва антибіотика і зробило його доступним для широкого використання в клінічній практиці під час Другої світової війни.

Термін *біотехнологія* був запропонований у 1917 р. угорським інженером Карлом Ерекі для опису процесу великомасштабного вирощування свиней з використанням як корму цукрового буряка. За означенням Ерекі, біотехнологія – *це всі види робіт, при яких із сировинних матеріалів за допомогою живих організмів виробляються ті або інші продукти*. Однак це абсолютно точне означення не набуло

широкого розповсюдження. Тривалий час термін "біотехнологія" пов'язували з двома доволі різними дисциплінами. З одного боку, його вживали, маючи на увазі промислову ферментацію, з іншого – застосовували до галузі, яка зараз називається ергономікою. Така подвійність припинилась лише у 1961 р., коли шведський мікробіолог Карл Гьорен Хеден порекомендував змінити назву наукового журналу "*Journal of Microbiological and Biochemical Engineering and Technology*" ("Журнал мікробіологічної та біохімічної інженерії і технології"), що спеціалізувався на публікації робіт із прикладної мікробіології та промислової ферментації, на "*Biotechnology and Bioengineering*" ("Біотехнологія і біоінженерія"). Саме з цього моменту біотехнологія стала чітко й необоротно пов'язаною з дослідженнями у сфері промислового виробництва товарів і послуг за участі живих організмів, біологічних систем і процесів.

Термін "біотехнологія" більшою мірою став асоціюватися з новим етапом розвитку галузі, початок якому був покладений у 1973 р., коли Стенлі Кoen і Герберт Бойер отримали рекомбінантні плазмиди та здійснили ними трансформацію клітин *Escherichia coli*. Упродовж лише чотирьох років після відкриття рекомбінантних ДНК-технологій з'явилися штами бактерій, що продукували інсулін і людський гормон росту. Це зумовило залучення інвестицій у нові біотехнологічні компанії.

У табл. 1.1 наведено основні факти, що характеризують розвиток біотехнології.

Таблиця 1.1. Найважливіші роки в історії розвитку біотехнології

Рік	Подія
1859	Луї Пастер приготував рідке живильне середовище
1881	Р. Кох запропонував метод культивування бактерій на стерильних шматочках картоплі та агарозних живильних середовищах
1893	В. Освальд з'ясував каталітичну функцію ферментів
1912	Ц. Нейберг розкрив механізм процесів бродіння
1917	Карл Ерекі запропонував термін "біотехнологія"

Продовження табл. 1

Рік	Подія
1928	Ф. Гріффіт описав явище трансформації в бактерій
1933	А. Ключвер та А. Перкін опублікували роботу "Методи вивчення обміну речовин у цвілевих грибів", у якій виклали технічні прийоми, а також підходи до оцінювання результатів, одержаних при глибинному культивуванні грибів. Почалося впровадження в біотехнологію великомасштабного герметичного обладнання, що забезпечує перебігання процесів у стерильних умовах
1936	Були розв'язані основні завдання щодо конструювання, створення й упровадження у практику необхідного обладнання, у тому числі біореактора (ферментера)
1938	А. Тізеліус розробив теорію електрофорезу
1943	Вироблено пеніцилін у промисловому масштабі
1944	Евері, Мак Леод і Мак Карті показали, що генетичний матеріал міститься у ДНК
1950	Ж. Моно розробив теоретичні основи безперервного керованого культивування мікроорганізмів, які згодом розвили у своїх дослідженнях М. Стефенсон, І. Молек, М. Ієрусалимський, І. Работнова, В. Бірюков
1952	У. Хейс описав плазмиду як позакромосомний фактор спадковості
1953	Уотсон і Крік визначили структуру молекули ДНК
1959	Японські вчені відкрили плазмиди стійкості до антибіотиків (К-фактор) у дизентерійної бактерії
1960	С. Очоа та А. Корнберг виділили білки, здатні "зшивати" нуклеотиди в полімерні ланцюжки, синтезуючи таким чином макромолекули ДНК
1961	Засновано журнал <i>"Biotechnology and Bioengineering"</i>
1961-1966	Розшифровано генетичний код
1962	Х. Корана синтезував хімічним способом функціональний ген
1970	Виділено першу ендонуклеазу рестрикції
1972	Х. Корана та ін. синтезували повнорозмірний ген тРНК
1973	Бойер і Коен поклали початок технології рекомбінантних ДНК
1975	М. Келлер і Ц. Мільштейн опублікували статтю "Довгоживучі культури гібридних клітин, що секретують антитіла визначеної специфічності", у якій описали метод одержання моноклональних антитіл

Закінчення табл. 1

Рік	Подія
1976	Видані перші інструкції, що регламентують роботи з рекомбінантними ДНК
1976	Розроблено методи визначення нуклеотидної послідовності ДНК
1978	Фірма <i>Genentech</i> випустила людський інсулін, отриманий за допомогою <i>E. coli</i>
1981	Дозволений для застосування у США перший діагностичний набір з моноклональними антитілами
1982	Дозволена для застосування у Європі перша вакцина для тварин, отримана за технологією рекомбінантних ДНК
1983	Для трансформації рослин застосовані гібридні Ті-плазмиди
1986	К. Мюлліс розробив метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)
1988	Почалося широкомасштабне виробництво обладнання і діагностичних наборів для ПЛР
1990	У США затверджений план випробувань генної терапії з використанням соматичних клітин людини
1990	Офіційно розпочалися роботи над проєктом "Геном людини"
1994-1995	Опубліковані детальні генетичні та фізичні карти хромосом людини
1996	Щорічний обсяг продажів першого рекомбінантного білка (еритропоєтину) перевищив 1 млрд дол
1997	Було клоновано ссавця з диференційованої соматичної клітини
2003	Розшифровано геном людини, що містить приблизно 30 тис. генів
2009	Національна мікробіологічна лабораторія у Вінніпезі завершує перше генетичне секвенування H1N1 вірусу грипу
2011	Випробовування вакцини проти малярії показує позитивні результати. Це перша вакцина проти паразитарної інфекції
2013	Створено перше біонічне око
2014	Міжнародний консорціум секвенування генома опублікував послідовність генома м'якої пшениці

Цілковитим обґрунтованим є припущення, що швидкість практичного впровадження біотехнологічних досягнень усе меншою мірою буде визначатися науковими і технічними умовами, а більше залежатиме від фактора фінансування й

капіталовкладення зацікавлених галузей промисловості та поліпшення технологічних схем, ринкових ситуацій і економічно обґрунтованої доцільності нових методів порівняно з раніше впровадженими технологіями іншого типу.

Галузі промисловості, у яких найефективніше буде конкурувати біотехнологія, включають виробництво їжі для людей і тварин, створення й виробництво нових матеріалів, здатних замінити ті, що виготовляються з використанням нафтохімії, створення альтернативних джерел енергії, розробку технології безвідходних виробництв, контроль і усунення забруднень, сільське господарство. Безсумнівно, біотехнологія має надзвичайно сильний вплив і на багато напрямів медицини, ветеринарії, фармацевтичної промисловості. Вищевикладене однозначно дозволяє розглядати її як міжгалузеву дисципліну, засновану на застосуванні багатопрофільної стратегії (різноманітних підходів) для розв'язання найрізноманітніших проблем.

В історії становлення біотехнології можна виділити п'ять основних етапів (періодів), які через їх важливість для розвитку біотехнології іноді не зовсім коректно називають ерами.

Допастерівська ера (до 1865 р.). У цей період біотехнологічними методами отримували пиво, вино, сир, хліб, йогурт, кефір, різного роду ферментовану їжу.

Пастерівська ера (1865–1940). Стали відомі мікроорганізми-продуценти, що дозволило створити виробництва етанолу, бутанолу, ацетону, гліцерину, оцтової кислоти, деяких вакцин, організувати процеси біологічного очищення стоків аеробними мікроорганізмами.

Ера антибіотиків (1940–1960). Були відкриті пеніцилін, стрептоміцин і багато інших антибіотиків, розроблені технології культивування клітин тварин і отримування вірусних вакцин, а також біотрансформації стероїдних гормонів.

Постантибіотична ера (1960–1975). Створено технології отримання амінокислот, мікробіологічного білка на парафінах нафти, ферментів, що використовуються у миючих засобах. Розроблено технологію іммобілізації ферментів (закріплення їх на носіях) для отримування глюкозо-фруктозних сиропів. До

аеробної обробки стоків додалася анаеробна обробка твердих відходів з одержанням біогазу. Відкрито мікробіологічний спосіб отримування полісахаридів (від ксантану для збільшення в'язкості продуктів нафтових свердловин до жувальної гумки). У цей період почали серйозно говорити про біогаз і технічний спирт як паливо для автомобілів.

Створено мікробіологічні технології синтезу вітамінів В3 та В12, а також мікопротеїну – міцеляльного мікроскопічного гриба, що використовується як заміник м'яса. Учені навчилися культивувати ізольовані рослинні клітини, що зумовило початок біотехнологічного виробництва багатьох цінних лікарських речовин з використанням величезного потенціалу лікарських рослин. До цього ж періоду можна віднести зародження біометалургії – бактеріального вилугування міді й цинку з руд.

Ера нової біотехнології (після 1975 р.). Характеризується розробкою генної інженерії, яка дозволила цілеспрямовано змінювати геном мікроорганізмів, привносити в нього властивості, запозичені з геномів рослин і тварин. Це дозволило створити мікробіологічну систему синтезу людського інсуліну, інтерферону, соматотропного і ростових гормонів тощо. Створено гібридну технологію, що дозволила отримувати моноклональні антитіла, які є основою для багатьох діагностичних засобів. З'явилися трансгенні рослини і тварини, що зазнали цілеспрямованого конструювання генома.

То як же узагальнити термін "біотехнологія"? *Біотехнологія – це цілеспрямоване одержання цінних продуктів, у процесі якого використовується біохімічна діяльність мікроорганізмів, ізольованих клітин або їхніх компонентів.*

Таке означення не є повністю вичерпним і однозначним, тому розглянемо його докладніше на прикладах. Найчастіше біотехнологію плутають із рослинництвом або тваринництвом. Наприклад, одержання пшениці з використанням води та добрив на перший погляд – біотехнологія. Однак у цьому випадку залучено біохімічну діяльність не ізольованих клітин, а цілої рослини, макроорганізму, що належить до вищих, багатоклітинних

організмів. Отже, це – не біотехнологія, а рослинництво. Отримання ліків з кореня женьшеню – також не біотехнологія. А от якщо з цього кореня за допомогою ферментів виділяють окремі клітини та культивують їх у спеціальному живильному середовищі, нарощуючи біомасу ізольованих клітин женьшеню, з якої шляхом настоювання можна отримати настільки ж цінні ліки, як і з цілого кореня, – це вже біотехнологія.

Інший приклад – виробництво молока. Молоко одержують від корови, вівці або іншого ссавця, тобто це – робота макроорганізмів, а не біотехнологія. А от отримання з молока кефіру, йогурту або іншого кисломолочного продукту, що ґрунтується на біохімічній діяльності молочнокислих бактерій – це цілком легітимна біотехнологія. У виробництві глюкози з крохмалю є процес гідролізу: розчин крохмалю підкисляють, нагрівають до певної температури та витримують деякий час. У результаті крохмаль розщеплюється на глюкозу, одержаний таким чином гідролізат є розчином глюкози з численними домішками. Це – суто хімічний, а не біотехнологічний процес. Є також інший шлях отримання глюкози з полісукрів – ферментативний гідроліз. У цьому випадку до суспензії крохмалю додають фермент, і під його дією також відбувається розщеплення крохмалю до глюкози, але за набагато м'якіших умов, без утворення небажаних домішок, з меншими втратами. Ферменти – це виділені з клітини білкові речовини, компоненти клітини. Отже, за означенням, цей процес є біотехнологією.

У всіх наведених прикладах підставою для віднесення процесу до біотехнології або до хімічної технології є те, за допомогою яких впливів здійснюється обробка продукту. Іноді звертають увагу на інше: яка сировина використовується – хімічна чи біологічна. Наприклад, дуже часто виробництво м'ясних продуктів відносять до біотехнології, обґрунтовуючи це тим, що вихідна сировина є продуктом біологічного походження. З таких міркувань, наприклад, приготування котлет – це також біотехнологія, хоча робочий процес полягає в подрібненні м'яса і його подальшій тепловій обробці, тобто

немає біохімічної діяльності мікроорганізмів або клітин, а отже, це – не біотехнологія. А ось обробка м'ясного фаршу певними заквасками та подальший режим дозрівання, що застосовується при виробництві дорогих сортів ковбас, – це, звісно, біотехнологія.

На сьогодні досягнення біотехнології є перспективними в таких сферах:

- промисловості (харчовій, фармацевтичній, хімічній, нафтогазовій) – застосування процесів біосинтезу та біотрансформації нових речовин на основі сконструйованих методами генної інженерії штамів бактерій і дріжджів із заданими властивостями із використанням процесу мікробіологічного синтезу;
- екології – підвищення ефективності захисту рослин, розробка екологічно безпечних технологій очищення стічних вод, утилізація відходів агропромислового комплексу, конструювання та модифікація екосистем;
- енергетиці – застосування нових відновлюваних джерел біоенергії, отриманих на основі мікробіологічного синтезу та модельованих фотосинтетичних процесів, біоконверсія біомаси в біогаз;
- сільському господарстві – розробка в галузі рослинництва трансгенних агрокультур, біологічних засобів захисту рослин, бактеріальних добрив, мікробіологічних методів рекультивації ґрунтів; у галузі тваринництва – створення ефективних кормових препаратів з рослинної, мікробної біомаси та відходів сільського господарства, репродукція тварин на основі ембріогенетичних методів;
- медицині – розробка ефективних і безпечних медичних біопрепаратів, моноклональних антитіл, діагностикумів, вакцин, розвиток імунобіотехнології в напрямі підвищення чутливості та специфічності імунаналізу захворювань інфекційної та неінфекційної етіології.

Запитання для самоконтролю

1. Хто і коли вперше запропонував термін "біотехнологія"? Який сенс було в нього вкладено?
2. Як можна поділити біотехнологічні продукти в історичному контексті?
3. Наведіть переваги впровадження біотехнологічних підходів у класичні хімічні, енергетичні та інші галузі виробництва.
4. Поясніть переваги хімічного синтезу нуклеїнових кислот порівняно із застосуванням ферментів. Хто розробив методiku цього процесу?
5. Наведіть найважливіші відкриття, що стали визначальними для становлення сучасної біотехнології.
6. Наведіть періоди ("ери") становлення біотехнології в історичному контексті.
7. Які з наведених етапів пивоваріння є біотехнологічними й чому:
 - а) пророщування ячменю;
 - б) затирання солоду;
 - в) вирощування ячменю та хмелю;
 - г) варіння (кип'ятіння) сусла;
 - д) бродіння;
 - е) фільтрація?

Глава 2

СИРОВИНА ДЛЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ВИРОБНИЦТВА

Нині сировиною для біотехнологічного процесу може бути практично будь-який біологічний об'єкт або його частина, головне, щоб він у достатній кількості містив ту біологічно активну молекулу, яка становить певний інтерес із погляду біотехнологічної переробки та створення на її основі конкурентоздатного біотехнологічного продукту. Дотепер найширше вживаними є два шляхи: 1) напрацювання цільового продукту (зазвичай білка) з використанням генетично модифікованих об'єктів; 2) застосування натуральних джерел сировини, зокрема донорської крові.

2.1. Отримання та значення рекомбінантних білків і пептидів

Конструкція для експресії (експресуюча конструкція) – це отримана *in vitro* комбінація генетичних елементів (фрагментів природних НК, нуклеотидних послідовностей цільового білка тощо), тобто штучно створена рекомбінантна послідовність нуклеотидів, яка здатна повністю забезпечити синтез цільового білка (пептиду) і власне відтворення у клітині-хазяїні. Зазвичай рекомбінантну ДНК отримують унаслідок злиття молекули векторної ДНК, здатної до реплікації у певній клітині-хазяїні, із ДНК, що кодує продукт, синтез якого необхідно забезпечити в цій же клітині. Векторами для отримання експресуючих конструкцій можуть бути плазміди, віруси чи штучні хромосоми

на основі дріжджових чи тваринних хромосомних елементів. На даний час існує чималий набір різноманітних систем, що дозволяють здійснювати експресію гетерологічних генів у бактеріях, дріжджах та інших організмах, включаючи людські клітини. Рекombінантні ДНК також називають химерними.

Мета оцінювання експресуючої конструкції – підтвердження того, що в клітину-хазяїна буде введена нуклеотидна послідовність, яка відповідає необхідному білку, і що вона зберігається в клітинній культурі до кінця продуктивного періоду.

Експресуюча конструкція, що містить кодуючу послідовність рекombінантного білка, має бути охарактеризована за допомогою методів дослідження нуклеїнових кислот. Оцінювання експресуючої конструкції на рівні нуклеїнової кислоти необхідно розглядати як частину оцінювання якості. Варто враховувати, що така перевірка переважно стосується лише кодуючої послідовності рекombінантного гена і не відповідає ні за точність його трансляції, ні за інші характеристики рекombінантного білка, такі як вторинна, третинна структура або посттрансляційні модифікації.

Необхідність оцінювання експресуючої конструкції зумовлюється можливістю виникнення мутацій у послідовності генів рекombінантного білка, який продукується в живих клітинах, що може змінювати його властивості та призводити до негативних наслідків при використанні готового продукту, отриманого на основі даного білка. Аналітична методика для встановлення нуклеотидної послідовності цільового гена має бути охарактеризована стосовно граничної здатності до виявлення зміненої послідовності. Такий аналіз необхідний, оскільки методи аналізу білків не завжди дозволяють установити всі зміни в структурі білка, що виникають у результаті мутацій.

Аналіз нуклеотидної послідовності може бути використаний для перевірки кодуючої послідовності й функціонального стану експресуючої конструкції. Він проводиться для підтвердження того, що білок, який експресуватиметься, матиме правильну амінокислотну послідовність. Якщо клітини-продуценти несуть множинні вбудовані копії експресуючої конструкції, не всі з яких

можуть бути транскрипційно активні, то перевірка власне продукту транскрипції шляхом аналізу мРНК або кДНК іноді виявляється більше інформативною, ніж аналіз геномної ДНК. Дослідження сумарних нуклеїнових кислот, наприклад матеріалу, ампліфікованого полімеразною ланцюговою реакцією, можна розглядати як альтернативу підходам, що ґрунтуються на відборі індивідуальних клонів ДНК. При дослідженні можуть бути використані також інші науково обґрунтовані методи, які дозволяють швидко і з високою точністю підтвердити наявність і якість кодуючої послідовності рекомбінантного білка в експресуючій конструкції.

Щодо гена, який використовуватиметься як кодуюча послідовність рекомбінантного білка, мають бути охарактеризовані такі параметри:

- джерело нуклеотидної послідовності, що кодує цільовий білок, методи одержання ДНК, що кодує цільовий білок;
- стадії збирання експресуючої конструкції, що включає походження і функцію її складників, наприклад точки початку реплікації, гени стійкості до антибіотиків, промотори, енхансери, чи є продукт білком злиття;
- інформація про лінію клітин і вектори, що можуть використовуватись під час продукування рекомбінантного білка;
- методи, що використовуються для введення вектора в клітину-хазяїна, відбір і клонування трансформантів, критерії відбору;
- локалізація вектора всередині клітини-хазяїна;
- нуклеотидні послідовності цільових генів і фланкуючих регуляторних ділянок векторів експресії. Мають бути зазначені області, секвеновані в процесі конструювання, і області, послідовності яких зазначені на підставі даних літератури. Послідовності сайтів з'єднання складових частин експресуючої конструкції при використанні лігування мають бути підтверджені секвенуванням;
- матеріали дослідження з використанням різних рестриктаз і методів саузерн- або нозерн-блоту, що підтверджують включення вектора в клітину-хазяїна;

- метод індукування експресії цільового гена та її контролю в процесі виробництва;
- ідентифікація всіх можливих експресуючих послідовностей;
- зазначення будь-яких додаткових модифікацій.

Клітини-продуценти мають бути охарактеризовані за генетичною однорідністю та стабільністю. Межу віку для клітин-продуцентів *in vitro* встановлюють на основі дослідження клітин, культивованих в умовах пілотного виробництва до передбачуваного віку та старше, і відтак підтверджують в умовах повномасштабного виробництва. Експресуюча конструкція клітин-продуцентів досліджується відповідно до положень, викладених вище, при цьому кодуєча послідовність може бути підтверджена або дослідженням нуклеїнової кислоти, або амінокислотним аналізом цільового білкового продукту.

При оцінюванні стабільності генетичні й фенотипічні характеристики системи хазяїн/вектор мають досліджуватися на матеріалі, отриманому до і після встановленого віку клітин-продуцентів *in vitro* (далі підтверджуватися при повномасштабному виробництві). Дослідження стабільності полягають в одержанні інформації про копійність гена, рівень і стабільність експресії білка, характеристиці рекомбінантного білка на рівні білка і/або послідовності ДНК (при використанні будь-якого методу має бути зазначена межа виявлення відхилень від установлених параметрів на основі проведеної валідації методики).

Будь-яке збільшення раніше встановленої межі віку клітин-продуцентів *in vitro* має бути обґрунтоване даними, отриманими на клітинах, які культивувалися до віку клітин *in vitro* такого, що дорівнює або перевищує нову межу віку клітин *in vitro*.

Вимоги до рекомбінантних білків. Одержані цільові білки мають бути охарактеризовані для підтвердження повної відповідності продукту до рекомбінантної ДНК.

Єдиного експериментального підходу, який дозволив би виявити всі можливі зміни в білку, не існує. Методи аналізу білка можуть включати визначення амінокислотної послідовності, структурних особливостей, що виникають у результаті

посттрансляційних модифікацій, таких як частковий протеоліз, глікозилування, фосфорилування, ацетилювання тощо.

Білковий препарат, що використовується для проведення доклінічних випробувань, має бути доволі повно охарактеризований за хімічними, імунохімічними й фізико-хімічними параметрами, включаючи вторинну та третинну структури молекули. Це зумовлено тим, що, по-перше, результати доклінічного дослідження мають стосуватися конкретно очищеного продукту, по-друге, при оцінюванні безпеки препарату методи, що застосовуються, багато в чому зумовлені наявністю в продукті конкретних домішок або контамінантів. При проведенні таких досліджень характеризують очищений білок – активну субстанцію препарату, у якій оцінюють молекулярну масу, первинну (у тому числі N- і C-кінцеві групи, заміни амінокислот), вторинну та третинну структури білка, вміст білка, чистоту активної речовини, вміст модифікованих, полімеризованих і деградованих форм рекомбінантного білка, а також неспецифічних домішок (речовин, що використовувалися під час отримання й очищення цільового продукту). За необхідності оцінюють вміст вуглеводів і ліпідів, ступінь глікозилування.

Дослідження характеристик очищеного білка мають включати якомога ширший спектр аналітичних методів, наприклад електрофорез у поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію за редуруючих і нередуруючих умов, капілярний електрофорез, ізоелектрофокусування, високоефективну рідинну хроматографію, пептидне картування, у тому числі в поєднанні із мас-спектрометрією, аналіз амінокислотної послідовності, круговий дихроїзм, вуглеводне картування та ін.

При виробництві необхідно використовувати максимально ефективні способи очистки білкового препарату від домішок і контамінантів, оскільки вони багато в чому визначають необхідність проведення досліджень для оцінювання безпеки препарату при доклінічних випробуваннях.

Стосовно неспецифічних домішок білковий препарат має бути охарактеризований за такими параметрами:

- наявність домішок білків клітини-хазяїна (бактерій, дріжджів, клітин ссавців тощо) або інших гетерологічних

білків (наприклад компонентів живильного середовища, носія для очищення за допомогою афінної хроматографії), які зумовлюють потенційний ризик розвитку алергійних реакцій і вияв інших імунopatологічних ефектів при застосуванні;

- наявність домішок нуклеїнових кислот штаму-продуцента, що теоретично не виключає можливості їх інтеграції в геном інших клітин;
- відсутність контамінації вірусами продуктів, отриманих із клітин-продуцентів, що містять ендогенний вірус.

Оскільки лінії клітин, що продукують гуманізовані моноклональні антитіла, зазвичай є пухлинними, то перспективним є подальше вдосконалення вимог з позицій характеристики продуктованих такими клітинами білків щодо онкогенності. Результати досліджень дозволять цілеспрямовано аналізувати ці білки в препаратах відповідних антитіл. Чистота білка має бути не менше 95 %. Нині багато виробників забезпечують чистоту не менше 97 %. Допустимий вміст домішок білків і нуклеїнових кислот клітин-продуцентів установлюють для кожного конкретного препарату.

Перелік досліджуваних фізико-хімічних показників для характеристики продукту зазвичай перевищує такі при включенні в нормативну документацію на субстанцію.

Таким чином, вичерпна характеристика експресуючої конструкції й очищеного білка, що експресується, – обов'язкові елементи доклінічних досліджень, необхідні для об'єктивного оцінювання результатів доклінічних випробувань безпеки й ефективності імунобіологічних препаратів, отриманих із використанням методів генної інженерії. Повнота характеристик нуклеїнової кислоти та білка може відрізнятися в різних продуктах, що залежить від доступності методів їх досліджень.

Запитання для самоконтролю

1. Що може бути попередником для вектора?
2. Які критерії є важливими при аналізі конструкції для експресії?
3. Які характеристики притаманні оптимальним клітинам-продуцентам?

4. Які методи доречні при дослідженні якості отриманого рекомбінантного білка?

5. Які параметри рекомбінантного білка необхідно визначати (контролювати) перед його масовим поширенням?

6. Наявність яких речовин є неприпустимою в очищеному рекомбінантному білку?

2.2. Продуценти рекомбінантних білків

Вибір продуцента значно впливає на економічний аспект розробки рекомбінантного продукту. Походження лінії клітини та її генетична стабільність – це ті критерії, які в першу чергу необхідно розглядати для забезпечення виробництва належного білка і його відповідності до регуляторних вимог.

Сьогодні у виробництві рекомбінантних білків найпоширенішими є грамнегативна бактерія *Escherichia coli* та культура клітин яєчника китайського хом'яка (СНО, *Chinese hamster ovary cell culture*). Білкові продукти також можуть нараблятися в дріжджах і клітинах комах. Нині надзвичайно зросла зацікавленість у використанні трансгенних тварин, особливо рослин для виробництва значних кількостей рекомбінантних білків і не лише білків, але й модифікованих ліпідних сполук як заміників палива, а також природних хімічних сполук як лікарських препаратів. Далі будуть розглянуті найпоширеніші організми-хазяї за зростанням складності їхньої організації.

Основою більшості сучасних біотехнологічних виробництв дотепер усе ще є мікробний синтез, тобто синтез різноманітних біологічно активних речовин за допомогою мікроорганізмів. На жаль, об'єкти рослинного і тваринного походження через низку причин поки не знайшли широкого застосування.

На сьогодні відносно добре охарактеризовано (або відомо) понад 100 тисяч різних видів мікроорганізмів. Це, у першу чергу, прокаріоти (бактерії, актиноміцети, рикетсії, ціанобактерії) і частина еукаріот (дріжджі, гриби, деякі найпростіші та водорості). При такому розмаїтті

мікроорганізмів дуже важливою й зазвичай складною проблемою є правильний вибір саме того організму, який здатний забезпечити отримання необхідного продукту, тобто служити промисловим цілям. Поділ мікроорганізмів на промислові й непромислові для осіб, далеких від мікробіології, молекулярної біології та молекулярної генетики, може видатися досить однозначним: ті мікроорганізми, які використовуються в промисловому виробництві, – промислові, а ті, які не використовуються, – непромислові.

Проте для тих, хто близько стикається з перерахованими вище галузями біологічних знань, межа проходить між нечисленною, але добре вивченою групою мікроорганізмів, що служать модельними об'єктами при дослідженнях фундаментальних життєвих процесів, і рештою мікроорганізмів, які зазвичай генетиками, молекулярними біологами та генними інженерами зовсім не досліджувалися або досліджувалися незначною мірою. До перших належать кишкова паличка (*Escherichia coli*), сінна паличка (*Bacillus subtilis*) і пекарські дріжджі (*Saccharomyces cerevisiae*).

З огляду на це в багатьох біотехнологічних процесах використовується обмежена кількість мікроорганізмів, які класифікуються як GRAS (*generally recognized as safe*) і зазвичай вважаються безпечними. До таких мікроорганізмів належать бактерії *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, інші види бацил і лактобацил, види *Streptomyces*. До цієї групи також відносять види грибів *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* і дріжджів *Saccharomyces* та ін. GRAS – мікроорганізми непатогенні, нетоксичні, вони переважно не синтезують антибіотиків, тому при розробці нового біотехнологічного процесу варто орієнтуватися на них як на базові об'єкти біотехнології.

Мікробіологічна промисловість сьогодні використовує тисячі штамів із сотень видів мікроорганізмів, які первинно були виділені з природних джерел на підставі їхніх корисних властивостей, а потім (здебільшого) поліпшені за допомогою різних методів відповідно до вимог виробничого процесу. У зв'язку з розширенням виробництва й асортименту продукції,

що випускається, у мікробіологічну промисловість залучаються нові й нові представники світу мікробів. Однак варто усвідомлювати, що найближчим часом жоден з них не буде вивчений так ретельно, як *Escherichia coli* та *Bacillus subtilis*. Пояснення цьому досить просте – колосальна трудомісткість і висока вартість подібного роду досліджень.

За таких умов виникає проблема розробки стратегії й тактики досліджень, які б дозволили з величезного потенціалу нових мікроорганізмів обрати та взаємодоповнити найцінніше при створенні промислово важливих штамів-продуцентів, придатних до використання в біотехнологічних процесах.

Класичний підхід полягає у виділенні потрібного мікроорганізму з природних умов існування. Для цього відбирають зразки матеріалу і роблять посів на селективне середовище, що забезпечує переважний розвиток потрібного мікроорганізму, тобто одержують накопичувальні культури. Наступним етапом є виділення чистої культури з подальшим диференційно-діагностичним вивченням ізольованого мікроорганізму і, якщо є потреба, орієнтовним визначенням його продуктивної здатності. Існує також інший шлях підбору мікроорганізмів-продуцентів – це вибір потрібного виду із існуючих колекцій добре вивчених і досконало охарактеризованих мікроорганізмів. При цьому зникає необхідність виконання багатьох трудомістких операцій.

Головним критерієм при виборі біотехнологічного об'єкта (у нашому випадку мікроорганізму-продуцента) є потенційна здатність синтезувати цільовий продукт. Однак, окрім цього, у технології самого процесу можуть закладатися додаткові вимоги, які часом бувають дуже важливими, навіть визначальними. Мікроорганізми повинні відповідати таким вимогам:

- мати високу швидкість росту;
- утилізувати необхідні для їхньої життєдіяльності дешеві субстрати;
- бути резистентними до сторонньої мікрофлори, тобто володіти високою конкурентоспроможністю.

Усе вищеперераховане зумовлює значне зниження витрат на виробництво цільового продукту. Звичайно, у кожному конкретному випадку визначальним є якийсь один із критеріїв, і це необхідно постійно враховувати. Нижче наведено окремі приклади особливих вимог до синтезуючих мікроорганізмів.

1. Одноклітинні організми зазвичай характеризуються інтенсивнішою швидкістю росту і синтетичних процесів, ніж вищі організми. Проте це властиво не всім мікроорганізмам. Існують мікроорганізми (наприклад оліготрофні), які ростуть украй повільно, однак вони становлять певний інтерес, оскільки здатні продукувати різні доволі цінні речовини.

2. Особливу увагу як об'єкти біотехнологічних розробок привертають мікроорганізми, здатні до фотосинтезу, що використовують у своїй життєдіяльності енергію сонячного світла. Частина з них (ціанобактерії та фотосинтезуючі еукаріоти) як джерело вуглецю утилізують CO_2 , а деякі представники ціанобактерій до того ж можуть засвоювати атмосферний азот (тобто вкрай невибагливі до поживних середовищ). Фотосинтезуючі мікроорганізми перспективні як продуценти аміаку, водню, білка і деяких органічних сполук. Проте прогресу в їх використанні через недостатність фундаментальних знань про їхню генетичну організацію й молекулярно-біологічні особливості метаболізму найближчим часом не варто очікувати.

3. Певна увага приділяється термофільним мікроорганізмам, що здатні рости при 60–80 °С. Така їхня властивість є практично нездоланною перешкодою для розвитку сторонньої мікрофлори при відносно нестерильному культивуванні, тобто надійним захистом від забруднень. Серед термофілів виявлені продуценти спиртів, амінокислот, ферментів, молекулярного водню. До того ж швидкість їх росту і метаболічна активність у 1,5–2 рази вища, ніж у мезофілів.

Ферменти, що синтезуються термофілами, характеризуються підвищеною стійкістю до нагрівання, деяких окиснювачів, детергентів, органічних розчинників та інших несприятливих факторів. Водночас вони малоактивні за звичайних температур.

Наприклад, протеолітичні ферменти одного з представників термофільних мікроорганізмів при 20 °С у 100 разів менш активні, ніж при 75 °С. Останнє є дуже важливою властивістю для деяких промислових виробництв. Наприклад, широкого застосування в генетичній інженерії набув фермент Таq-полімераза з термофільної бактерії *Thermus aquaticus*.

Метою виділення будь-якого рекомбінантного гена є одержання його повноцінної експресії в штучних генетичних системах. Експресія еукаріотичних генів у бактеріях перебігає неефективно через утворення тілець включень і відсутності необхідних посттрансляційних модифікацій рекомбінантних поліпептидних ланцюгів. Тому використовуються культивовані клітини тварин і рослин, у геном яких рекомбінантні гени вводяться за допомогою трансфекції.

Ефективний синтез рекомбінантних білків залежить не лише від клітинних ліній, що використовуються, але й від конструкції експресуючого вектора та методу введення рекомбінантних ДНК в еукаріотичні клітини. Для підвищення рівня експресії рекомбінантних генів, стабільно інтегрованих у геном клітин, що культивуються, розроблені методи селективної ампліфікації. Використання одного з таких методів дозволило отримати мутантні сублінії клітин CHO, у яких ампліфікація відбувається в присутності селектуючого агента, наприклад метотрексату. Інші системи ампліфікації засновані на пригніченні експресії життєво важливих ферментів, наприклад глутамінсинтетази або аденозиндезамінази, під дією специфічних інгібіторів: метіонінсульфоксиміну або 2'-дезоксикоформіцину, відповідно.

Для отримання рекомбінантних білків, крім методу стабільно трансфікованих ліній клітин, використовують ще два підходи. З метою одержання невеликої кількості рекомбінантних білків і контролю функціональної цілісності генно-інженерних конструкцій застосовують вектори, що тимчасово експресуються і мають здатність до реплікації в культивованих клітинах у позахромосомному стані. У такому випадку джерелом рекомбінантних білків є супернатанти клітин. При іншому підході рекомбінантні білки синтезують у

культивованих клітинах комах після їх зараження векторами на основі генома бакуловірусів. Останній підхід допускає стабільну експресію багатьох рекомбінантних генів, продукти яких можуть перебувати як усередині клітин, так і в асоційованому з поверхнею клітин стані, або секретуватися в культуральну рідину.

Характеристика лінії CHO (Chinese hamster ovary cell) – клітин яєчників китайського хом'яка (рис. 2.1)¹.

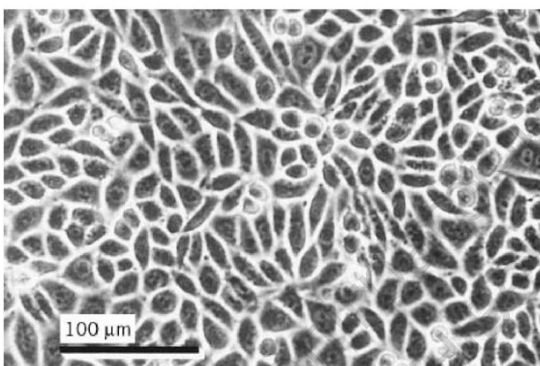


Рис. 2.1. Конфлюентна культура CHO-K1. Фазово-контрастна мікроскопія при 20× об'єктиві

Лінія клітин CHO та її похідні використовуються для синтезу рекомбінантних білків після попередньої ендогенної ампліфікації відповідних рекомбінантних генів, уведених у клітини за допомогою трансфекції.

Спонтанна ампліфікація генів у нормальних клітинах тварин є рідкісним явищем, а в трансформованих (пухлинних) клітинах вона відбувається з частотою 10^{-4} – 10^{-6} на клітинну генерацію. Частоту ампліфікації певних генів можна підвищити в результаті екзогенних впливів, включаючи інкубацію клітин з гідроксисечовиною, афідіколіном, канцерогенами, під дією ультрафіолетового спектра світла або гамма-випромінювання та за умов гіпоксії. Ампліфікація гена зазвичай починається його вирізанням із хромосоми у складі сегмента ДНК, що супроводжується утворенням кільцевої структури, яка продовжує існувати у вигляді позахромосомного елемента (подвійної міні-хромосоми, DM),

¹ American Type Culture Collection (ATCC) catalogue. <http://what-when-how.com/molecular-biology/cho-cells-molecular-biology/>

здатного до автономної реплікації. Припускають, що DM є проміжним продуктом ампліфікації, який утворюється за умов низького тиску селектуючого фактора навколишнього середовища. На пізніших стадіях ДНК, що ампліфікується, після повторної інтеграції в геном виявляється переважно у складі подовженої ділянки хромосоми (ECR – *extended chromosomal region*), яка інакше називається областю, що гомогенно зафарбовується (HSR – *homogeneously staining region*). На цій стадії ампліфікована ділянка генома клітин, а отже, їхній фенотип стають стабільнішими.

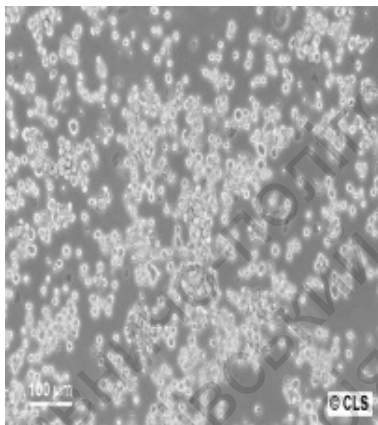
Для біотехнологічних цілей у системі ампліфікації рекомбінантних генів як селектуючий маркер часто використовують ген дигідрофолатредуктази (ДГФР), інтегрований у експресуючий вектор. ДГФР каталізує перетворення фолієвої кислоти на тетрагідрофолат, необхідний для синтезу еукаріотичними клітинами гліцину, тимідинмонофосфату і пуринових основ. Саме тому клітини СНО, у яких ген ДГФР інактивований під дією мутації, не ростуть на середовищах без нуклеозидів, але набувають цієї здатності після трансфекції вектором з геном ДГФР.

Трансфектанти далі відбираються за ознакою ампліфікації гена ДГФР на тлі зростаючих концентрацій метотрексату – інгібітору ДГФР, оскільки збільшення кількості копій гена буде надавати клітинам стійкості до інгібітору в значних концентраціях. Після проведення множинних раундів селекції одержують популяцію клітин, що містить до кількох сотень копій гена ДГФР.

Розмір ампліфікованого геномного локусу значно більший за розмір селектованого гена і може становити кілька сотень тисяч пар основ. Трансфекція клітин геном ДГФР і цільовим рекомбінантним геном, поміщеними в один експресуючий вектор, яка супроводжується їхньою інтеграцією в геном, спричинятиме їхню спільну ампліфікацію на тлі впливу метотрексату та посилення синтезу необхідного рекомбінантного білка і, як наслідок, – збільшення частки його гена. Дані щодо можливості збереження високого рівня

експресії гена за відсутності селектуючого агента, тобто генетичної стабільності продуцентів, суперечливі. Результат залежить від генотипу конкретних клонів клітин, у тому числі й локалізації сайту інтеграції експресуючого вектора в геном клітин СНО. Ефективним експресуючим вектором, що використовується в описаній системі, є двоцистронна молекула ДНК, у якій цільовий рекомбінантний ген перебуває під контролем сильного промотору перед геном ДГФР, що забезпечує високе поєднання синтезу рекомбінантного білка з рівнем стійкості клітин до метотрексату.

Клітини мишачої мієломи (лінія Sp2/0) (рис.2.2)². Клітини мієломи застосовуються для одержання гібридом – ліній клітин, що виробляють моноклональні антитіла певної специфічності.



**Рис. 2.2. Культура Sp2/0 Ag14.
CLS Cell Lines Service GmbH**

Оскільки ці клітини здійснюють ефективну секрецію рекомбінантних білків, вони добре вивчені щодо експресії в них відповідних рекомбінантних генів, уведених за допомогою трансфекції. Клітини здатні рости в суспензійній культурі (без прикріплення до поверхні субстрату), що полегшує їх культивування за необхідності великомасштабного виробництва.

Лінія клітин мишачої мієломи Sp2/0 Ag14, що втратили здатність синтезувати або секретувати імуноглобуліни, використовується для виробництва рекомбінантних білків. Клітини цієї лінії легко трансфікуються рекомбінантними ДНК і можуть вирощуватися у значних кількостях на живильному середовищі без використання дорогої сироватки. Клітини Sp2/0

² <https://clsgmbh.de/artikeldet.php?sprachnrs=2&sid=udhldp9402p4ubi202d3qtp7dl&proid=2958>

експресують власний ендегенний ген ДГФР, що унеможливує їх безпосереднє використання для ампліфікації рекомбінантних ДНК із застосуванням метотрексату. Цю перешкоду можна подолати шляхом уведення в експресуючий вектор мутантного гена ДГФР, у якому точкова мутація, яка супроводжується заміною Т→Г, спричиняє заміщення Leu→Arg у положенні 22 поліпептидного ланцюга ДГФР, наслідком чого є зниження спорідненості ферменту до метотрексату у 270 разів. Завдяки цьому після трансфекції можна зробити відбір клітин, що містять мутантний ген ДГФР замість нормального, шляхом поступового збільшення концентрації метотрексату в середовищі. За помірних концентрацій інгібітору ендегенний ген ДГФР повністю інактивується, тоді як мутантний ген залишається активним і може бути ампліфікований після підвищення концентрації метотрексату в середовищі. Рівень ампліфікації гена ДГФР і асоційованого з ним рекомбінантного гена в такій системі є нижчим, ніж у звичайній, оскільки менша кількість внутрішньоклітинних копій мутантного гена потрібна для забезпечення необхідного рівня стійкості клітин до інгібітору. Крім того, було показано, що високий рівень внутрішньоклітинної експресії рекомбінантних генів, уведених у клітини Sp2/0 за допомогою трансфекції, може бути забезпеченим після інкубації з метотрексатом за рахунок збільшення швидкості їх транскрипції, а не внаслідок ампліфікації. Такий результат можна отримати при введенні множинних копій гена ДГФР при трансфекції.

Клітини селезінки мишей (лінія MEL). У природі унікальні гени (ті, що наявні у вигляді однієї копії на гаплоїдний геном) можуть характеризуватися дуже високою ефективністю експресії. Прикладом такого явища є імуноглобуліни, що секретуються плазматичними клітинами, і глобіни, що синтезуються у великих кількостях клітинами еритроїдного ряду. Високий рівень транскрипції глобінового локусу можливий не лише завдяки функціонуванню ефективних промотору та енансеру, але й у результаті наявності домінантної регуляторної ділянки (DCR – *dominant control region*), яка змінює просторову структуру хроматину всього локусу.

DCR розташована за 50 т. п. о. перед кластером глобінових генів і була ідентифікована завдяки наявності в ній сайтів, гіперчутливих до ДНКаз. Шляхом комбінування послідовностей нуклеотидів, що оточують сайти, удалось сконструювати невелику штучну DCR-послідовність, яка володіла основними властивостями вихідної. Рекombінантні гени у векторі з такою послідовністю експресувалися з високою ефективністю у клітинах еритроїдного ряду незалежно від місця їх інтеграції в геном і не вимагали попередньої ампліфікації.

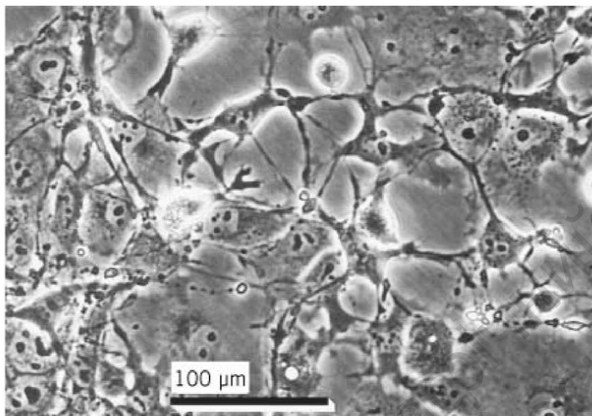
Розглянута система дозволила уникнути негативного впливу "ефекту розташування" рекombінантних генів, що позбавляє необхідності скринінгу значної кількості трансфікованих клітин для одержання високопродуктивних продуцентів рекombінантних білків.

Для біотехнологічних цілей використовується лінія клітин MEL-E9, яка є похідною від лінії клітин MEL-NP5, отриманих із селезінки мишей NFS, заражених дефектним по реплікації вірусом некрозу селезінки (SSFV – *spleen focus forming virus*). Ці клітини не утворюють вірусних часток, але зумовлюють формування пухлин після ін'єкції сингенним мишам. Такі клітини не зазнають спонтанного диференціювання, проте під дією екзогенних факторів (диметилсульфоксиду, геміну або гексаметиленбісацетаміду) диференціюються у клітини, що містять гемоглобін.

Фібробласти нирки африканської зеленої мавпи (лінія COS).

Тимчасова експресія генів у фібробластоподібних клітинах COS використовується для швидкого напрацювання рекombінантних білків і ДНК. При конструюванні клітин COS клітини нирки зеленої африканської мавпи CV-1 були іморталізовані вірусом SV40 з дефектною ділянкою початку реплікації. У результаті були отримані три лінії клітин (COS-1, COS-2 і COS-7), які конститутивно експресують великий Т-антиген вірусу. Після проведення трансфекції клітин експресуючими плазмідами, що містять область початку реплікації вірусу SV40, остання ефективно взаємодіє з ендogenous Т-антигеном і спричиняє позахромосомну реплікацію плазмиди з утворенням значної кількості її копій у цитоплазмі клітин. Якщо рекombінантний

ген у такій плазміді перебуває під контролем належного промотору, то це зумовлює внутрішньоклітинне утворення рекомбінантних білків у значних кількостях (рис. 2.3³)



**Рис. 2.3. Конфлюентна культура Cos-7.
Фазово-контрастна мікроскопія**

Кількість копій плазмиди, уведеної у клітини COS, досягає максимуму приблизно через 48 год після трансфекції. Далі внутрішньоклітинний рівень плазмідної ДНК починає поступово знижуватися через її

цитотоксичну дію й загибель клітин. Тому системи, засновані на клітинах COS, не можуть використовуватися для промислового, масштабного напрацювання рекомбінантних білків упродовж тривалого проміжку часу. Максимальний внутрішньоклітинний вміст рекомбінантних білків у таких системах спостерігається через 72 год після трансфекції, а їх синтез триває впродовж наступних 5–10 днів на тлі повільного зниження кількості клітин у культурі, що дає можливість використовувати клітини COS для препаративного синтезу рекомбінантних білків. З цією метою трансфекції одночасно піддають до 10^8 клітин з подальшим їх вирощуванням на ролерах або мікроносіях, що супроводжується багаторазовим збиранням культуральної рідини й дозволяє отримувати до кількох міліграмів рекомбінантного білка з такого пулу трансфікованих клітин.

³ American Type Culture Collection (ATCC) catalogue.
<http://what-when-how.com/molecular-biology/cos-cells-molecular-biology/>

Ефективність системи експресії, заснованої на клітинах COS, залежить від природи рекомбінантного білка, яка визначає його чутливість до внутрішньоклітинних протеїназ, а також від методу трансфекції, співвідношення кількості клітин і молекул рекомбінантних плазмід, що використовуються для трансфекції, і складу живильного середовища

Генетична трансформація організмів. Культури трансформованих клітин ссавців використовують для одержання різних необхідних речовин. Хоча культури клітин тварин, особливо при масовому вирощуванні, економічно набагато менше вигідні, ніж бактеріальні чи дріжджові, вони мають істотну перевагу – здатність здійснювати досить важливі посттрансляційні модифікації білків – продуктів генів ссавців. Наприклад, для ефективного функціонування деяких білків необхідне приєднання до них молекул вуглеводів, ліпідів або фосфатних груп тощо. Синтез і приєднання таких модифікуючих молекул – звичайний процес для клітин ссавців, тоді як бактеріальні клітини не здатні забезпечувати подібні модифікації.

Крім створення клітин-продуцентів для отримання певних продуктів, трансформація соматичних клітин ссавців дозволяє вивчати тонкі механізми складної регуляції експресії генів і цілеспрямовано модифікувати генетичний апарат клітини тварин, а за необхідності й людини, що має величезне значення для медичної генетики.

Культури клітин ссавців можуть виявитися ефективним джерелом виділення деяких вірусних антигенів з метою одержання вакцин для тварин і людини. Отримувати такі вакцинні культури клітин можна за допомогою техніки рекомбінантних ДНК і векторів експресії для клітин ссавців і людини. При використанні ДНК-вакцин в організм вводиться не антиген, а ген, що кодує синтез цього антигену. Ген вбудовується в плазмиду, а плазміда вводиться в організм шляхом звичайної ін'єкції.

Створення генетично модифікованих тварин є одним із ключових напрямів розвитку біотехнологій у тваринництві. Сучасні підходи спрямовані на створення трансгенних тварин, які характеризуються зміненими або принципово новими

властивостями, що значно розширює асортимент і спектр виробленої продукції тваринництва відповідно до потреб сучасного ринку.

Нині розвиваються такі напрями використання трансгенних технологій у тваринництві:

- створення тварин-продуцентів біологічно активних рекомбінантних білків для медицини, ветеринарії та харчової промисловості;
- створення тварин-моделей захворювань людини і тварин;
- створення трансгенних тварин-донорів внутрішніх органів для трансплантації;
- створення трансгенних тварин зі зміненою якістю тваринницької продукції.

Пріоритетність розвитку зазначених напрямів трансгенезу у тваринництві зумовлена потребами сучасного ринку і спрямована на їх задоволення за рахунок розробки ефективних і конкурентоспроможних технологій одержання рекомбінантних білків фармакологічного, ветеринарного і харчового призначення. Трансгенні технології забезпечують створення принципово нових видів продукції для різних галузей медицини (трансплантаційної, фармакологічної тощо), а також підвищення продуктивності сільськогосподарських тварин і якості виробленої продукції, тобто продовольчу базу країни.

Ринковий сегмент генетично модифікованих тварин представлений сьогодні лише продукцією, яку одержують від трансгенних тварин – продуцентів біологічно активних рекомбінантних білків терапевтичного та діагностичного призначення. Дозвіл, наданий у 2006 р. Європейським агентством з оцінювання лікарських препаратів (ЕМА) на використання антитромбіну III людини, виробленого з молока трансгенних тварин, відкрив нову еру у виробництві рекомбінантних білків лікарського призначення. Нині цей продукт залишається єдиним, одержаним від трансгенних тварин, який дозволений для широкого використання.

Розвиток зазначеного сегменту ринку зумовлений потребою у виробничих системах, які здатні ефективно виробляти

рекомбінантні білки та/або антитіла, світова потреба в яких становить 100 кг на рік і більше (дані FDA). Основним ринковим фактором зростання цього сегменту є те, що: 1) трансгенні тварини – це біореактори, які здатні забезпечити 10-1000-кратний рівень синтезу рекомбінантних білків з молока або білка курячих яєць порівняно з традиційними культуральними клітинними системами; 2) значно менші виробничі затрати. Наприклад, за даними одного з лідерів ринку, компанії GTC, вартість моноклональних антитіл, вироблених із молока трансгенних кіз, становить 105 дол США за грам, а при використанні традиційних культуральних клітинних систем – 300–3000 дол США за грам. Згідно з даними Інституту тваринництва Нойштат (Німеччина), світовий ринок фармакологічних білків, вироблених трансгенними тваринами, на 2013 р. становив 18,6 млрд дол.

Лідером ринку рекомбінантних білків, вироблених трансгенними тваринами, є компанія *Genzyme Transgenics Corporation* (GTC, США), яка у 2006 р. вивела на ринки США та Європи перший рекомбінантний продукт, вироблений з молока трансгенних кіз, – антитромбін III людини, світова потреба в якому становить 50 кг на рік. Сьогодні компанія виробляє з молока трансгенних тварин ще близько 50 рекомбінантних білків і моноклональних антитіл терапевтичного й діагностичного призначення, які перебувають на різних стадіях клінічних і доклінічних випробувань.

Стійкі позиції на ринку білків, вироблених трансгенними тваринами, займає компанія *Pharming Group NV* (Голландія). Продукт компанії – інгібітор C1 системи комплементу людини, який виробляється трансгенними тваринами, – перебуває у фазі III клінічних випробувань. Окрім того, ця компанія займається виведенням на ринок рекомбінантного лактоферину людини, який виробляється з молока трансгенних корів.

Лідерами в розробці рекомбінантних білків, які виробляються з білка курячих яєць, є компанія *AviGenics* (Джорджія, США) і *Viragen* (Флорида, США).

Культури клітин комах для застосування бакуловірусів.

Родина бакуловірусів має геном у вигляді дволанцюгової

кільцевої ДНК довжиною 80–220 т. п. н. У природі коло хазяїв бакуловірусів обмежене членистоногими. Клітини ссавців можуть бути заражені бакуловірусами лише за високої множинності інфекції, що є одним з механізмів доставки рекомбінантної ДНК у такі клітини. Однак вірус лише проникає у клітини й у них не відтворюється, не експресує рекомбінантні гени з промоторів комах і не здатен перебувати (персистувати) у клітинах тварин тривалий час.

Зацікавленість у бакуловірусах як потенційних переносниках рекомбінантних генів і системах, що забезпечують їх експресію, виникла після того, як була виявлена їхня здатність до синтезу значної кількості вірусних білків на пізніх стадіях інфекції. Зокрема, це стосується вірусних поліедрини і білка p10, гени яких перебувають під контролем сильних пізніх промоторів і які можуть бути вилучені без шкоди для розмноження вірусів. Тому заміщення генів зазначених білків цільовими рекомбінантними супроводжується посиленням експресії останніх.

На початку використання бакуловірусів у культурах клітин виникали певні труднощі через екзотичність і новизну об'єкта дослідження. Однак згодом були розроблені численні варіанти рекомбінантних вірусів і векторів на їх основі, включаючи човникові вектори для клітин дріжджів і бактерій. Крім того, успіх цієї системи пов'язаний з одержанням зручних ліній клітин комах. Клітинними лініями, що найчастіше використовуються, є лінія IPLB-Sf-21-AE, отримана з метелика-шкідника сільгоспкультур *Spodoptera frugiperda*, її клональна похідна Sf 9, а також BTI-TN-BTI-TN-5B1-4i TN368 із *Trichoplusia ni*. Клітинні лінії комах вирощують у вигляді суспензійних культур на ролерах і у ферментерах на живильних середовищах, що не містять фетальної сироватки й тим самим значно здешевлюють виробництво білка.

Вияви біологічної активності багатьох рекомбінантних білків неможливі без посттрансляційних модифікацій їх поліпептидних ланцюгів. Клітини комах здатні до багатьох модифікацій, зокрема глікозилювання, фосфорилювання, ацилювання й амідування. Рекомбінантні білки можуть зазнавати адекватної протеолітичної обробки шляхом видалення сигнальних послідовностей

амінокислот і транспортуватися у відповідні клітинні компартменти. Однак дослідження механізмів N-глікозилування у клітинах комах показали, що воно не відповідає повною мірою такому процесу в клітинах ссавців.

Отже, вектори на основі бакуловірусів широко використовуються для одержання гетерологічних білків у культурах клітин комах і ссавців. Сучасні бакуловірусні системи дозволяють експресувати в одній інфікованій клітині комах одночасно кілька генів і отримувати мультимерні білки, функціонально близькі до природних аналогів. Рекombінантні віруси, що містять промотори, активні в клітинах ссавців, використовуються для доставки та експресії генів у клітинах ссавців *in vitro* та *in vivo*. Подальше вдосконалювання системи на основі бакуловірусів для використання в клітинах-мішенях різного типу може відкрити додаткові можливості застосування таких експресуючих систем.

Генетично модифіковані рослини як продуценти рекombінантних білків. Нині провідними біотехнологічними центрами світу модифіковано більше ніж 150 видів рослин. Створені трансгенні рослини, стійкі до гербіцидів, комах-шкідників, вірусів і хвороб, рослини зі збалансованим складом амінокислот і зміненим складом жирних кислот, декоративні рослини зі зміненим пігментним забарвленням квітів. Найбільшим успіхом у сфері генетичної інженерії є створення під керівництвом професора І. Потрікуса (Швейцарія) нового сорту рису, який одержав назву "Золотий". Його особливість і перевага – підвищений вміст провітаміну А, заліза й фолієвої кислоти. Створено трансгенні рослини, що здатні до біодеградації полімерів, детоксикації важких металів, для очищення навколишнього середовища від різного роду забруднень.

Останні десятиліття характеризуються зростанням інтересу до трансгенних рослин як біопродуцентів різних білків медичного призначення. При одержанні рекombінантних білків актуальним залишається пошук високоефективних і економічно вигідних систем експресії для їх напрацювання. Сьогодні для виробництва рекombінантних терапевтичних білків, субодиничних вакцин і рекombінантних моноклональних антитіл використовуються

бактерії, дріжджі, а також культури клітин комах і ссавців. Кожна із систем має не лише переваги, а й недоліки, пов'язані з недосконалістю систем посттрансляційних модифікацій рекомбінантних білків, тривалістю наробітку продукту, обмеженим проліферативним потенціалом, високою вартістю компонентів для підтримання культури тощо.

Нові перспективи одержання рекомбінантних фармацевтичних білків відкриваються з використанням генетично модифікованих рослин. Відповідно до оцінок експертів, трансгенні рослини можуть бути дешевшим і безпечнішим джерелом рекомбінантних білків порівняно з традиційними системами експресії. Привабливість рослин як систем експресії для накопичення рекомбінантних фармацевтично цінних білків забезпечується багатьма обставинами. Насамперед у рослинних тканинах відсутній ризик забруднення рекомбінантного білка патогенами тваринного походження – вірусами та пріонами. Рослинні клітини забезпечують правильну посттрансляційну модифікацію рекомбінантного білка, характерну для еукаріотичних клітин, а також його самоскладання та фолдинг.

Експресовані в рослинних клітинах рекомбінантні білки можуть бути спрямовані в різні компартменти рослинної клітини (вакуолі або люмени ендоплазматичного ретикулума), а також в апопласт і різні органи рослини (насіння, бульби, плоди тощо). Перевагою є також те, що в рослинних тканинах рекомбінантні білки можуть тривалий час (місяці і роки) зберігатися без будь-яких змін і зниження біологічної активності.

Нові методи агробіологічної розробки господарсько важливих видів рослин, а також системи насінництва для тієї чи іншої культури роблять рослини привабливими для використання як біофабрик рекомбінантних білків медичного призначення.

Не піддаючись термообробці, рослини можуть бути готовим продуктом для профілактики й лікування захворювань. Рослини, у тканинах яких синтезуються й накопичуються рекомбінантні бактеріальні антигени, привабливі для використання як вакцини й одержали спеціальну назву – "їстівні вакцини". Більше того, трансгенні рослини є зручними моделями для розробки нових,

альтернативних способів доставки (перорально та інтраназально) рекомбінантних білків в організм теплокровних.

На сьогодні розроблені технології одержання генетично модифікованих (трансгенних) рослин, у геном яких привнесені гени, що кодують різні білки для медичних цілей, у тому числі й білки людини. Такі технології засновані на прямому або векторному перенесенні цільових генів у ядерний геном рослини. Отримані десятки видів трансгенних рослин, у геном яких перенесені гени антигенів різних збудників інфекційних захворювань, різноманітних терапевтичних білків, моноклональних антитіл. Однак відносно невисокий рівень накопичення цільових білків (менше 1 % від загального розчинного білка – ЗРБ) у тканинах генетично модифікованих рослин є негативною особливістю використання їх як продуцентів рекомбінантних білків, що зумовлює пошук особливих, нових систем експресії.

Однією з таких альтернативних систем експресії можуть бути позаядерні геноми (пластоми) хлоропластів рослин. Одержання транспластомних рослин, тобто рослин, у хлоропластний геном яких будуть перенесені чужорідні гени, обіцяє безліч переваг порівняно з ядерними трансформантами, а саме: високу експресію перенесених генів, можливість поліцистронного регулювання, екологічну безпеку, пов'язану з відсутністю чужорідних генів у пилку; відсутність варіабельності за експресією цільових генів, а також ефекту "замовкання" трансгенів у транспластомних рослин. Однак необхідно підкреслити, що ці переваги нівелюються значними проблемами, з якими стикаються дослідники при спробах перенести гени в пластоми рослин.

Потужним поштовхом до розвитку технології одержання рекомбінантних білків на основі хлоропластного генома стало повідомлення про створення транспластомних рослин тютюну з виходом цільового білка (Cry₂Aa₂-білок з *Bacillus thuringiensis*) на рівні 46,1 % ЗРБ. На основі хлоропластних геномів інтенсивно розвиваються технології створення транспластомних рослин для багатьох легкодоступних видів, зокрема сої, бавовни, салату та ін. Загалом до теперішнього часу отримано

15 видів транспластомних рослин, у яких рівень накопичення гетерологічних білків становив від 6 % для інтерферону- γ та 19 % – для інтерферону- α і до 33 % – для інсуліноподібного фактора росту (IGF-1) людини.

Серед інших альтернативних хазяїв для систем експресії гетерологічних білків у фармакології варто назвати ряску, мохи, деякі види водоростей, а також клітини генетично модифікованих рослин, що культивуються у суспензійній культурі.

Ряска (*Lemna gibba* – ряска горбата і *L. minor* – ряска мала) – багаторічна рослина, середовище існування якої – поверхні стоячих прісних вод. Ряска належить до квіткових рослин, але її тіло редуковане і представлене листовою пластинкою та коренем. Ряска є представником однодольних покритонасінних рослин, для перенесення в її геном чужорідних гетерологічних генів можуть бути використані системи агробактеріальної трансформації та методи біолістики.

Ряска привертає увагу дослідників як потенційна високоефективна система експресії гетерологічних білків завдяки здатності до швидкого накопичення біомаси, яка може подвоюватися впродовж 24–48 год. Генетично модифікована ряска як потенційний продуцент фармакологічних білків може бути використана для вживання безпосередньо в сирому вигляді або у вигляді висушеного продукту. За наявності в генетичній конструкції відповідних сигнальних послідовностей рекомбінантний білок може секретуватися в культуральне середовище. Необхідно зазначити, що моноклональні антитіла людини, синтезовані у тканинах ряски, виявляли вищу активність при зв'язуванні з відповідними рецепторами порівняно з їхніми гомологами, синтезованими у клітинах СНО-лінії клітин яєчників китайських хом'яків. Близькі до завершення роботи із секвенування хлоропластного генома ряски.

Зелені мохи (*Physcomitrella patens*) – єдиний представник мохоподібних, геном якого повністю секвенований. Розроблено методику трансформації *Physcomitrella patens*. Першим успішним прикладом використання цього виду мохів як системи експресії рекомбінантних білків є одержання рекомбінантного людського еритропоєтину. Фірма "Grenovation" (Німеччина) розробляє технологію виробництва

біофармацевтичних білків на основі *Physcomitrella patens* у клітинній суспензійній культурі з використанням біореакторів.

Привабливість цього виду мохів як системи експресії рекомбінантних білків полягає в тому, що порівняно з рослинами фрагменти екзогенних ДНК можуть бути інтегровані в його геном за механізмом гомологічної рекомбінації, що унеможливорює інактивування і втрату надалі перенесених генів (трансгенів). *Physcomitrella patens* розглядається як перспективний кандидат на "молекулярне фермерство", оскільки в цій системі експресії білки еукаріотичного походження зазнають посттрансляційних модифікацій (глікозилювання, утворення дисульфідних зв'язків тощо). Якщо порівнювати білковий продукт, синтезований у клітинах тварин і клітинах *Physcomitrella patens*, то останні мають очевидну перевагу, оскільки зникає проблема зараження культури патогенами тваринного походження. Привабливою рисою *Physcomitrella patens* є також те, що його можна підтримувати у вигляді суспензійної культури в контрольованих умовах.

Одноклітинні зелені водорості (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis suecica* та *Odontella aurita*) розглядаються як перспективні альтернативні системи експресії рекомбінантних білків. Найперспективнішим видом є *Chlamydomonas reinhardtii*, одержання рекомбінантних білків у якого ґрунтується на трансформації хлоропластів. Близько 40 % об'єму клітини цієї рослини займає один великий хлоропласт. Перші генетично модифіковані водорості на основі *Chlamydomonas reinhardtii* були отримані в 1988 р. Інтеграція фрагментів екзогенних ДНК у геном цієї водорості відбувається за механізмом гомологічної рекомбінації. Клітинні популяції водоростей гомогенні за розмірами клітин, клітинна маса подвоюється через кожні 4–8 год культивування. Для культивування *Chlamydomonas reinhardtii* можливе використання біореакторів великих об'ємів (до 500 тис. л); більше того, здатність секретувати білки в культуральне середовище може істотно знизити вартість цільового продукту.

Суспензійні клітинні культури на основі генетично модифікованих рослин привертають увагу дослідників як перспективні потенційні системи для отримання фармацевтичних

білків. Такі культури можуть бути виділені з калусних тканин, індуковані з генетично модифікованих експлантів або на основі культивування клітинної суспензії *Agrobacterium tumefaciens*. Варто підкреслити, що після оцінювання ростових характеристик і відбору рослинних клітинних ліній за здатністю накопичувати рекомбінантні білки можуть бути відібрані перспективні лінії для культивування у біореакторах.

Розробляються клітинні лінії для виробництва рекомбінантних білків у комерційних цілях на основі клітинних культур моркви й рису (наприклад компанія "Protalix", Ізраїль). Для цього широко використовують клітинні культури тютюну. У 2006 р. у США фірмі "Dow AgroSciences" була видана ліцензія на спосіб одержання вакцини проти збудника хвороби Ньюкасла (псевдочума, азіатська чума курей) на основі суспензійної клітинної культури тютюну. Привабливою особливістю клітинних культур як системи експресії для рекомбінантних білків порівняно з цілими рослинами є те, що клітинні культури можна уніфікувати за ростовими характеристиками, розміром і типами клітин. Більше того, клітини вирощуються у строго контрольованих умовах, за яких швидкість накопичення продукту не буде змінюватися від пасажу до пасажу.

Запитання для самоконтролю

1. Які організми найчастіше є продуцентами рекомбінантних білків? Чому?
2. Що означає абревіатура GRAS?
3. Наведіть основні вимоги до мікроорганізмів-продуцентів.
4. Наведіть переваги термофілів як продуцентів.
5. Який ген найчастіше використовують як селективний маркер для векторів клітин СНО?
6. Яка речовина є інгібітором дигідрофолатредуктази (ДГФР)?
7. Що таке домінантна регуляторна послідовність DCR?
8. Перерахуйте критерії, що вплинуть на ефективність експресії рекомбінантного білка.
9. Які тварини на сьогоднішній день найчастіше використовуються для синтезу рекомбінантних білків? Чому?

10. Який білок у промислових масштабах виробляється цілісним організмом ссавців?

11. Які рослини є оптимальними продуцентами рекомбінантних білків?

12. Що таке транспластомні рослини?

2.3. Натуральна сировина в біотехнології

Як натуральну сировину в біотехнології використовують токсини різних безхребетних, морських гідробіонтів, отрути рептилій і плазунів, молоко ссавців та ін. Рослини як цінні джерела різноманітних біомолекул, що можуть бути основою біотехнологічних продуктів, також широко використовують у біотехнологічній промисловості для цілеспрямованого виділення біополімерів відомої направленої дії. Однак дотепер одним з найпоширеніших натуральних джерел сировини є донорська кров.

Кров людини становить приблизно 8 % від маси тіла. Складається вона з клітин, клітинних фрагментів і плазми. Частка клітинних елементів у загальному об'ємі називається *гематокритом* і становить 45 %. Основну масу розчинних речовин плазми крові становлять білки. Їх концентрація перебуває в межах 60–80 г/л, тим самим становить приблизно 4 % від усіх білків організму. У плазмі крові людини міститься близько 100 різних білків. За рухливістю при електрофоретичному розділенні можна отримати:

- за допомогою електрофорезу на папері – 5 фракцій;
- в агарозному гелі – 7–8 фракцій;
- у крохмальному гелі – 16–18 фракцій;
- методом імуоелектрофорезу – близько 30 фракцій;
- у поліакриламідному гелі (залежно від умов) можна виділити майже усі білки.

Якщо використовувати електрофорез на папері, то білки крові можна грубо розділити на 5 фракцій: альбумін, α_1 -, α_2 -, β - і γ -глобуліни. Поділ на альбумін і глобуліни спочатку ґрунтувався на відмінності в розчинності: альбуміни розчинні в чистій воді, а глобуліни – лише за наявності солей (табл. 2).

Таблиця 2.1. Білки плазми крові

Група №	Білки	Молекулярна маса, кДа	Функція
1 Альбуміни	Транстиретин Альбумін	50-66 67	Транспорт тироксину і трийодтироніну Підтримка осмотичного тиску, транспорт жирних кислот, білірубину, жовчних кислот, стероїдних гормонів, ліків і неорганічних іонів
2 α_1 -глобуліни	Антитрипсин Антихімотрипсин Ліпопротеїни (ЛВЩ) Протромбін Транскортин Кислий глікопротеїн Тироксин-зв'язувальний глобулін	51 8-68 200-400 72 51 44 54	Інгібування трипсину та інших протеїназ Інгібування хімотрипсину Транспорт ліпідів Фактор згортання крові II, попередник тромбіну Транспорт кортизолу, кортикостерону і прогестерону Транспорт прогестерону Транспорт тироксину і трийодтироніну
3 α_2 -глобуліни	Церулоплазмін Антитромбін III Гаптоглобін Холінестераза Плазміноген Макроглобулін	135 58 100 близько 350 90 725	Транспорт іонів міді Інгібування процесу згортання крові Зв'язування гемоглобіну Розщеплення ефірів холіну Попередник плазміну

Закінченням табл. 2.1

Група №	Білки	Молекулярна маса, кДа	Функція
3 α_2 -глобуліни	Ретинол-зв'язувальний білок	21	Зв'язування протеїназ, транспорт іонів цинку Транспорт вітаміну А Танспорт кальциферолів
	Вітамін Д-зв'язувальний білок	52	
4 β -глобуліни	Ліпопротеїни (ЛНЩ)	2000-4500	Транспорт ліпідів Транспорт іонів заліза Фактор згортання крові І Транспорт тестостерону й естрадіолу Транспорт вітаміну В ₁₂ Активация комплекменту
	Трансферин	80	
	Фібриноген	330	
	Глобулін, що зв'язує статеві гормони	65	
	Транскобаламін	38	
5 γ -глобуліни	С-реактивний білок	110	
	Ig G	150	Усі представлені білки мають відношення до імунних процесів в організмі
	Ig A	360	
	Ig M	935	
	Ig D	172	
	Ig E	196	

У табл. 2.1 перелічені лише найтипівіші представники кожної з п'яти фракцій білків плазми крові, отримані, як зазначалось вище, методом електрофоретичного поділу на папері.

Окрім білків варто зазначити наявність у плазмі крові окремих амінокислот (табл. 2.2) і гормонів (табл. 2.3).

Таблиця 2.2. Вміст амінокислот у плазмі крові

Амінокислота	Вміст, мкмоль/л	Амінокислота	Вміст, мкмоль/л
Гліцин	250,3–344,6	Аргінін	91,8–172,2
Аланін	359,0–628,3	Лізін	143,9–363,1
Метіонін	20,1–33,6	Глутамінова кислота	54,4–74,8
Валін	188,1–273,6	Глутамін	513,8–568,6
Лейцин	129,7–251,8	Пролін	222,2
Ізолейцин	121,1–152,6	Серин	110,4
Тирозин	77,3–82,8	Треонін	159,6–176,4
Фенілаланін	84,7–114,9	Гістидин	109,7–135,5
Триптофан	49,0	Цистеїн	166,6–249,9

Таблиця 2.3. Вміст гормонів у плазмі крові

Гормони	Вміст у крові, нмоль/л	Метод
Адренокортикотропний гормон (АКТГ)	16,4–32,8	Радіоімунологічний
17-оксикортикостероїди плазми	280–700	Колориметричний
11-оксикортикостероїди сумарні	390–640	Флуориметричний
11-оксикортикостероїди вільні	5–10 % від сумарних (при вагітності збільшується майже у 2 рази)	Флуориметричний
Кортизол	140–640	Радіоімунологічний
Гідрокортизон	160 ± 16	Радіоімунологічний

Наявність у плазмі крові всіх перерахованих компонентів (білків, амінокислот, гормонів) і відносна простота одержання значних кількостей крові не лише людської, але й великої рогатої худоби, в умовах збереження нативної структури більшості присутніх у ній макромолекул дозволяє віднести кров до одного з головних природних джерел біотехнологічних продуктів. Перелік цих продуктів досить довгий, він включає як загальноживані препарати: альбуміни, протеїни, імуноглобуліни людини різного призначення, фактори VIII та IX, діагностичні сироватки, а також препарати специфічного призначення – різноманітні білки, амінокислоти, гормони.

Специфічні антитіла, що використовуються в лікувальних цілях, випускаються у вигляді імунних сироваток або імунологічно активних фракцій – імуноглобулінів. Їх готують із крові людей (гомологічні) або тварин (гетерологічні). Гомологічні імунні препарати мають певну перевагу перед гетерологічними, зумовлену їх довгою (до 1–2 місяців) циркуляцією в організмі та відсутністю побічних ефектів. Сироватки й імуноглобуліни, одержані з крові тварин, діють порівняно недовго (1–2 тижні) і здатні викликати побічні реакції. Їх можна застосовувати лише після перевірки чутливості організму хворого за допомогою підшкірної проби з розведеними препаратами. Сироватку призначають при негативній пробі після попередньої десенсибілізації організму, яку здійснюють шляхом послідовного підшкірного (з інтервалом у 30–60 хв) введення її невеликих доз. Потім внутрішньом'язово вводять усю дозу лікувальної сироватки. При окремих формах екзотоксичних інфекцій 1/2–1/3 частина препарату при першому його введенні може застосовуватися внутрішньовенно.

При позитивній пробі на чутливість до чужорідного білка гетерологічні препарати вводять під наркозом або, при застосуванні більших доз, разом із глюкокортикоїдами. Уводять гетерологічні сироватки в усіх випадках після постановки хворому крапельниці (на тлі крапельного введення кристалічних розчинів). Така процедура дозволяє негайно надати допомогу у

випадку розвитку екстрених станів, пов'язаних із застосуванням чужорідного білка.

Ефективність імунних сироваток (імуноглобулінів) значною мірою визначається оптимальною їх дозою і своєчасністю застосування. Доза препарату має відповідати клінічній формі інфекційного процесу та бути здатною нейтралізувати не лише циркулюючі в цей момент у організмі антигени збудників захворювання, але й ті, які можуть з'явитися у проміжок часу між уведеннями препарату. Антимікробний і клінічний ефект імунних сироваток (імуноглобулінів) буде тим вищим, чим раніше вони почнуть застосовуватися. Призначення їх після четвертого – п'ятого дня захворювання рідко дає виражений позитивний результат.

Є значний досвід застосування в клінічній практиці препаратів імуноглобулінів. Проведені більше 15 років тому клінічні випробування гіперімунної плазми, що містить високі титри антитіл до ендотоксину грамнегативних бактерій, показали достовірне зниження летальності в пацієнтів із грамнегативною бактеріємією та септичним шоком. Однак для реалізації специфічної дії антитіл необхідно точно встановити етіологію збудника. Емпіричне застосування цих препаратів може виявитися неефективним.

На початку 1990-х рр. була здійснена спроба використання іншого препарату – гіперімунної плазми, яка містить у високому титрі антитіла, що перехресно зв'язують антигенну детермінанту в центральній частині ендотоксину, спільного для всіх грамнегативних бактерій. Передбачалося, що такі антитіла будуть здатні зв'язувати ендотоксини різних грамнегативних бактерій. Клінічні випробування були проведені з поліклональними IgG (із плазми донорів) і моноклональними IgG та IgM (генноінженерними) антитілами. Однак під час випробувань були одержані досить суперечливі результати, що не дозволили рекомендувати ці препарати для широкого клінічного застосування.

Невдачі у створенні нових імунних препаратів сприяли перегляду перспектив імунозамісної терапії за допомогою

природних імунних препаратів – імуноглобулінів основних класів, призначених для внутрішньовенного введення. Значною мірою це пов'язано із вищим технологічним рівнем виготовлення препаратів і надійним захистом реципієнта від небезпеки передачі, у першу чергу, вірусної інфекції.

Запитання для самоконтролю

1. Які речовини відносять до натуральної сировини в біотехнології?
2. Поясніть різницю між гомо- та гетерологічними імунними препаратами.
3. Чи є певні часові обмеження щодо застосування імуноглобулінів при лікуванні інфекцій?

Глава 3

ХАРАКТЕРИСТИКА СКЛАДОВИХ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ

3.1. Узагальнення етапів біотехнологічних процесів. Біооб'єкти. Апаратура

Переваги виробництва органічних продуктів біотехнологічними методами порівняно з хімічними досить різноманітні, серед них:

- багато складних органічних молекул, зокрема таких як білки чи антибіотики, не можуть бути синтезовані з використанням хімічних методів;
- біоконверсія забезпечує значно ефективніший вихід цільового продукту;
- біологічні системи функціонують за нижчих температур, вищих значень рН (близьких до нейтрального) тощо;
- каталітичні біологічні реакції є більш специфічними, ніж реакції хімічного каталізу;
- біологічні процеси забезпечують утворення переважно чистих ізомерів одного типу, а не їхніх сумішей, як це часто відбувається в реакціях хімічного синтезу.

Однак разом з тим біологічні способи одержання органічних продуктів мають низку недоліків порівняно з хімічними методами:

- біологічні системи можуть бути забруднені сторонньою, небажаною мікрофлорою;
- цільовий продукт, що синтезується біологічним способом, зазвичай входить до складу суміші, що зумовлює необхідність його відділення від домішок;

- біотехнологічні виробництва потребують значних кількостей води, яку необхідно видаляти, скидаючи в навколишнє середовище;
- біопроцеси зазвичай перебігають повільніше порівняно зі стандартними хімічними реакціями.

Для кожного біотехнологічного процесу має бути розроблена відповідна схема, а сам процес має ретельно контролюватися на кожній стадії.

Важливим завданням будь-якого біотехнологічного процесу є розробка й оптимізація науково обґрунтованої технології та відповідного обладнання. Для організації біотехнологічних виробництв частково був запозичений досвід більш розвиненої на той час хімічної технології. Однак біотехнологічні процеси істотно відрізняються від хімічних, оскільки в біотехнології використовують складніше організовану матерію – біологічну. Кожен біологічний об'єкт (клітина, фермент тощо) – це автономна саморегульовальна система. Природа біологічних процесів складна й остаточно не з'ясована. Для мікробних популяцій, наприклад, характерна значна гетерогенність за низкою ознак – вік, фізіологічна активність, стійкість до впливу несприятливих факторів середовища тощо. Вони також схильні до випадкових мутацій, частота яких становить від 10^{-4} до 10^{-8} . Гетерогенність також може бути зумовлена наявністю поверхонь розділення фаз і неоднорідністю умов середовища, а отже, і культивування.

Мета етапів очищення полягає в тому, щоб виділити продукт від початкової стадії до стадії кінцевої формуляції найбільш економічним і безпечним способом.

Технологію очищення цільового продукту зазвичай поділяють на два основні етапи: USP (*upstream processing*) і DSP (*downstream processing*). Початковий етап накопичення цільового білка клітинами-продуцентами називають upstream-процесингом. Відповідно переведення продукту в розчинну форму, звільнення від макроскопічних домішок (клітин, органел, уламків мембран і клітинних стінок, нерозчинних білкових асоціатів тощо), початкове фракціонування одержаної

суміші білків та остаточне очищення біотехнологічного продукту для створення з нього харчового або фармацевтичного препарату називають downstream-процесингом.

У свою чергу, DSP поділяють на три етапи: вилучення цільового білка, очищення та "полірування" (рис. 3.1). Такий поділ досить умовний, іноді технологію взагалі не можна поділити на такі виокремлені етапи, особливо коли йдеться про використання натуральної сировини, проте загалом він дає можливість певною мірою позиціонувати ту чи іншу стадію процесу та сформулювати необхідні заходи безпеки щодо неї.

Успішна стратегія розробки такої технології полягає в тому, щоб взаємно узгодити *upstream*- і *downstream*-етапи, знайти оптимальну комбінацію, наприклад культивування, концентрування клітин і умов очищення. З іншого боку, правильна стратегія має включати методологію, яка дозволяє як максималізувати, так і мінімізувати масштаби процесу. У зв'язку з тим, що проектування, розробка й виправлення етапів очищення потребують багато часу, з позицій "правильної" економіки необхідно розуміти можливості й обмеження різних методів очищення при масштабуванні виробництва. Оскільки етап очищення може бути одним з найдорожчих у заключному процесі виробництва, то витрати можна мінімізувати шляхом ретельного проектування його стадій.

Поділ біотехнологічного процесу на складові може дещо відрізнятись від представленого вище, хоча загалом перебуває в межах загальної схеми.

1. Для процесів, що перебігають із залученням мікроорганізмів, біотехнологічний процес включає 3 стадії: *доферментаційну, ферментаційну і постферментаційну*.

2. У випадку використання продуцента немікробного походження стадії біотехнологічного процесу будуть такими: *доферментаційна* стадія замінюється *стадією попередньої підготовки сировини до виділення цільового біотехнологічного продукту, постферментаційна – стадією виділення цільового продукту*.

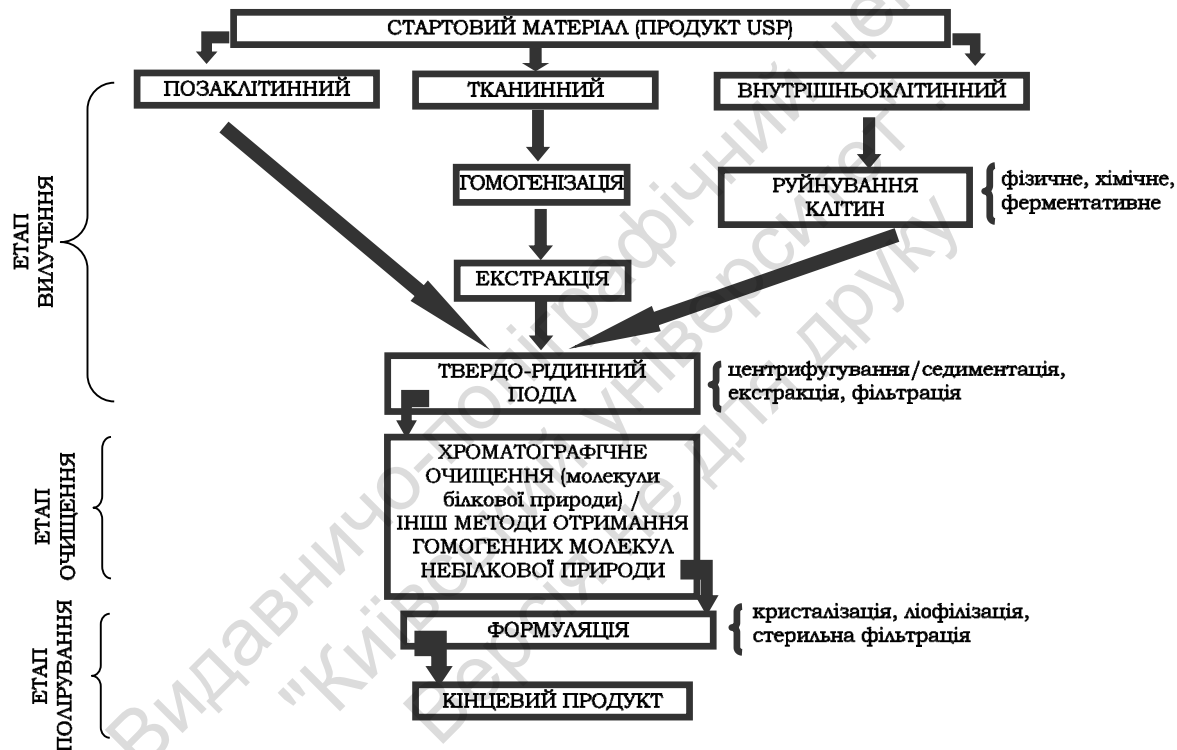


Рис. 3.1. Етапи біотехнологічного виробництва

На доферментаційній стадії здійснюють зберігання та підготовку культури продуцента (інокуляту), отримання й підготовку субстратів і середовищ, ферментаційної апаратури, технологічної та рециркульованої води й повітря. Підтримання і підготовка чистої культури є дуже важливим моментом доферментаційної стадії, тому що продуцент, його фізіолого-біохімічні характеристики та властивості переважно визначають ефективність усього біотехнологічного процесу. У відділі чистої культури зберігають виробничі штами, забезпечують їх реактивацію й наробіток інокуляту в кількостях, необхідних для початку процесу. При вирощуванні посівних доз інокуляту застосовують принцип масштабування, тобто проводять послідовне нарощування біомаси продуцента в колбах, бутлях, далі – у серії послідовних ферментерів. Кожний наступний етап відрізняється за об'ємом від попереднього зазвичай на порядок. Отриманий інокулят по стерильній посівній лінії надходить далі в апарат, у якому реалізується *ферментаційна* стадія. Приготування живильних середовищ здійснюється у спеціальних реакторах, обладнаних мішалками. Залежно від розчинності та сумісності компонентів середовищ можуть бути задіяні окремі реактори. Технологія приготування середовищ значно ускладнюється, якщо до їх складу входять нерозчинні компоненти. У різних біотехнологічних процесах застосовують різні за походженням і кількістю субстрати, тому процес їх приготування варіює. Дозування живильних компонентів підбирається і здійснюється індивідуально на кожному виробництві відповідно до технологічного регламенту конкретного процесу. За дозуюче обладнання беруться пристрої для вимірювання ваги й об'єму, що використовуються у харчовій і хімічній промисловості. Транспортування речовин здійснюється насосами, стрічковими та шнековими транспортерами. Сипучі компоненти подають у ферментери за допомогою вакуумних насосів. Часто застосовують принцип попередніх сумішей, тобто солі попередньо розчиняють, а потім транспортують по трубопроводах, дозуючи їх подачу за об'ємом. З огляду на надзвичайне різноманіття біотехнологічних процесів, середовищ, методів і апаратури, що використовуються

для їх реалізації, розгляд даних елементів далі буде пов'язаний з конкретними біотехнологічними виробництвами.

Стадія *ферментації* є основною в біотехнологічному процесі, оскільки саме на ній відбувається взаємодія продуцента із субстратом і утворення цільових продуктів (біомас, ендо- та екзопродуктів). Ця стадія перебігає в біохімічному реакторі (ферментері) і може бути організована різними способами залежно від особливостей продуцента і вимог до типу та якості кінцевого продукту. Ферментація може перебігати у строго асептичних умовах або ж без дотримання правил стерильності (незахищена ферментація), на рідких і твердих середовищах, анаеробно й аеробно. Аеробна ферментація, у свою чергу, може перебігати поверхово або глибинно (у всій товщі живильного середовища). Культивування біологічних об'єктів може здійснюватися в періодичному і проточному режимах, напівбезперервно з підживленням субстратом.

При періодичному способі культивування ферментер заповнюється вихідним живильним середовищем та інокулятом мікроорганізмів. Упродовж певного періоду в апараті відбувається взаємодія мікроорганізмів і субстрату, що супроводжується утворенням у культурі продукту. Біохімічні перетворення в цьому апараті тривають від десятків годин до кількох діб. Контроль і регуляція умов усередині ферментера – найважливіше завдання не лише періодичного культивування мікроорганізмів, а й будь-якого іншого. Під час періодичної ферментації культура проходить низку послідовних стадій: 1) лаг-фазу; 2) експоненціальну; 3) уповільнення росту; 4) стаціонарну фазу; 5) фазу відмирання. При цьому відбуваються суттєві зміни фізіологічного стану біооб'єкта, а також деяких параметрів середовища. Цільові продукти утворюються в експоненціальній (первинні метаболіти – ферменти, амінокислоти, вітаміни) і стаціонарній (вторинні метаболіти – антибіотики) фазах, тому, залежно від цілей біотехнологічного процесу, у сучасних промислових процесах застосовують принцип диференційованих режимів культивування. У результаті створюються умови для максимального наробітку того або іншого цільового продукту.

Періодично ферментер спорожняють, проводять виділення й очищення продукту, і починається новий цикл.

Безперервний процес культивування мікроорганізмів має істотні переваги над періодичним. Безперервна ферментація здійснюється в умовах сталого режиму, коли мікробна популяція та її продукти найбільш однорідні. Застосування безперервних процесів ферментації створює умови для ефективного регулювання і керування процесами біосинтезу. Системи безперервної ферментації можуть бути організовані за принципом повного витіснення або повного змішування. Перший випадок – тубулярна культура. Процес ферментації відбувається в довгій трубі, у яку з одного кінця безперервно надходять живильні компоненти та інокулят, а з іншого – з тією самою швидкістю витікає культуральна рідина. Така система проточної ферментації є гетерогенною. При безперервній ферментації у ферментерах повного змішування (гомогенно-проточний спосіб) у всьому об'ємі ферментаційного апарата створюються однакові умови. Застосування таких систем ферментації дозволяє ефективно керувати окремими стадіями, а також усім біотехнологічним процесом, і стабілізувати продуцент практично в будь-якому необхідному експериментаторові або біотехнологу стані. Керування подібними установками здійснюється двома способами. Турбидиметричний спосіб ґрунтується на вимірюванні каламутності вихідного потоку. Вимірювання каламутності мікробної суспензії, викликаной ростом клітин, є мірою швидкості росту, з якою мікроорганізми виходять із біореактора. Це дозволяє регулювати швидкість надходження у ферментер свіжого живильного середовища. Другий метод контролю, хемостатний, простіший. Керування процесом у хемостаті здійснюється вимірюванням не вихідного, а вхідного потоку. При цьому концентрацію одного з компонентів живильного середовища (вуглець, кисень, азот тощо), що надходить у ферментер, установлюють на обмежувальному рівні, а решта компонентів перебувають у надлишку, тобто лімітуюча концентрація заданого біогенного елемента обмежує швидкість розмноження клітин у культурі.

Забезпечення процесу ферментації, з погляду інженерної реалізації, зводиться до дозування надходження у ферментер потоків інокуляту, повітря (або газових сумішей), живильних біогенів тощо й відведення тепла, відпрацьованого повітря, культуральної рідини, а також вимірювання і стабілізації основних параметрів процесу на рівні, необхідному для оптимального розвитку продуцента й утворення цільового продукту. Під час ферментації утворюються складні суміші, що містять клітини, позаклітинні метаболіти, залишкові концентрації вихідного субстрату. Цільові продукти зазвичай перебувають у такій суміші в невеликих концентраціях, багато з них легко руйнуються. Усе це накладає істотні обмеження на методи отримання та сушіння біологічних препаратів.

Завершальні стадії біотехнологічних процесів – *отримання цільового продукту (постферментаційні)* – істотно розрізняються залежно від того, накопичується продукт у клітині чи виділяється в культуральну рідину, або ж продуктом є власне клітинна біомаса. Найскладнішим є отримання внутрішньоклітинного продукту. При цьому клітини необхідно відокремити від середовища культивування, зруйнувати, а потім цільовий продукт очистити від залишків зруйнованих клітин. Отримання продукту істотно полегшується, якщо він екскретується продуцентом у культуральну рідину. Тому одним з важливих завдань біотехнології є створення промислових штамів мікроорганізмів, що секретують багато цінних продуктів у значних кількостях.

Технологія отримання й очищення великою мірою залежить від природи цільового продукту. У деяких випадках існує можливість не здійснювати ретельне очищення продукту, якщо він володіє необхідними активностями в неочищеному стані, а домішки сторонніх речовин не впливають на безпеку і наслідки його використання. Деякі традиційні біотехнологічні процеси взагалі виключають етап отримання продукту.

Емпірична схема, представлена на рис. 3.1, показує загальні шляхи перетворення вихідної сировини на біотехнологічний продукт. Залежно від сировини й цільового біотехнологічного продукту в схемі можливі значні зміни та спрощення.

При виборі методу отримання і концентрування того чи іншого продукту мікробіологічного синтезу необхідно враховувати такі фактори:

- фізико-хімічні властивості культуральної рідини;
- властивості самого продукту (його термолабільність, стійкість до різних хімічних агентів, рН тощо);
- вимоги до кінцевої форми продукту (ступені чистоти й концентрування);
- технологічні й техніко-економічні показники (вихід продукту, продуктивність обладнання, необхідність подальшої обробки тощо).

Усі методи отримання продуктів мікробіологічного синтезу з культуральної рідини можна поділити на дві групи:

1) екстракція, іонний обмін, адсорбція, кристалізація – за умови, що цільовий продукт перебуває в розчині;

2) осадження, фільтрування, центрифугування, сепарування – за умови, що цільовий продукт перебуває у вигляді твердої фази.

Часто неможливо отримати цільовий продукт за допомогою лише одного методу. Тоді застосовують комбінацію кількох методів і в процесі отримання переводять продукт із розчинної форми в нерозчинну (або навпаки). Зазвичай при отриманні розчинених речовин культуральну рідину піддають попередній обробці й очищенню за допомогою осадження, фільтрування, центрифугування, сепарування і мембранних методів (електродіаліз, ультра- та мікрофільтрація).

Біологічні об'єкти. Для того, щоб розглянути характеристики складових біотехнологічних процесів, слід згадати означення біотехнології, що дає австралійська компанія "*Bachelor of Technology Management*":

"Біотехнологія – це використання наукових та інженерних принципів для виробництва матеріалів за допомогою біологічних об'єктів з метою надання людству сервісу або товарів. За біологічні об'єкти визнано рослини, тварини, бактерії, гриби, рослинні та тваринні клітини, частини вищезгаданого, наприклад ферменти. Продукти біотехнології розповсюджені скрізь і включають:

1) продукти харчування, тобто молочні продукти, спирти та їхні похідні, пекарські дріжджі, сою, гриби, протеїн одноклітинних організмів, БАДи (глутамат натрію, барвники тощо);

2) лікарські засоби, тобто антибіотики, діагностичні речовини, вакцини, стероїди;

3) хімікати, тобто тонкі хімічні реактиви (ферменти, полімери), сировину для хіміко-біологічного виробництва (етанол, ацетон, бутанол, органічні кислоти);

4) сільгосппродукти, тобто корма для тварин, продукти силосування та компостування, мікробні біоциди, азотфіксувальні інокулянти, рослинні клітини та культури тканин;

5) обслуговуючу індустрію, тобто очищення води, знешкодження технічних викидів, біологічну очистку, аналітичні інструменти (біочіпи);

6) енергетичні джерела, тобто етанол (газохол), метан (біогаз).

З наведеного означення можна зробити такі висновки:

- біотехнологія – не наука, а процес виробництва;
- визначальним фактором біотехнології є кінцевий результат у вигляді біологічного продукту, наприклад лікарський засіб або сировина для нього, складний реагент або діагностичний набір, продукт харчування людини, тварин або середовище для росту клітин, інструмент для очистки води та її контролю або джерело енергії;
- джерелом біотехнологічного продукту має бути біологічний об'єкт;
- оскільки біотехнологія – процес виробничий, то він має бути економічно обґрунтованим і фінансово вигідним.

У випадку, коли процес відповідає цим чотирьом вимогам, він є біотехнологічним. Основними елементами біотехнологічних процесів є біологічний об'єкт, сировина, апаратура і продукт.

Біологічний об'єкт є активним початком у біотехнологічних процесах і одним з найважливіших елементів. Номенклатура біологічних об'єктів бурхливо

розширюється, але дотепер найважливіше місце посідає традиційний об'єкт – мікробна клітина.

Мікробні клітини з різними хіміко-технологічними властивостями можуть бути отримані з природних джерел, а відтак за допомогою традиційних (селекція, добір) і новітніх методів (клітинна і генетична інженерія) значно модифіковані та поліпшені. При виборі біологічного об'єкта і його впровадження у виробництво насамперед слід дотримуватися принципу технологічності штамів. Це означає, що мікробна клітина, популяція або угруповання мають зберігати свої основні фізіолого-біохімічні властивості в процесі тривалої ферментації. Промислові продуценти також мають бути стійкими до мутаційних впливів, фагів, зараження сторонньою мікрофлорою (контамінації); не мати побічних токсичних продуктів обміну і відходів; характеризуватися безпечністю для людей і навколишнього середовища, високим виходом продукту та прийнятними техніко-економічними показниками.

На сьогодні багато промислових мікробних технологій базуються на використанні гетеротрофних організмів, а в майбутньому вирішальне місце серед продуцентів займуть автотрофні мікроорганізми, які не потребують для росту дефіцитних органічних середовищ, а також екстремофіли – організми, що розвиваються в екстремальних умовах (термофільні, алкало- й ацидофільні). В останні роки значно збільшується застосування змішаних мікробних культур та їхніх природних асоціацій. Порівняно з монокультурами мікробні асоціації здатні асимілювати складні, неоднорідні за складом субстрати, мінералізувати органічні сполуки, характеризуються підвищеною здатністю до біотрансформації, стійкістю до впливу несприятливих факторів середовища і токсичних речовин, а також підвищеною продуктивністю і можливістю обміну генетичною інформацією між окремими видами угруповання. Основні галузі застосування змішаних культур – охорона навколишнього середовища, біодеградація, засвоєння складних субстратів тощо.

Особлива група біологічних об'єктів у біотехнології – ферменти, каталізатори біологічного походження. Ферменти

все більше застосовуються в біотехнологічних процесах і галузях господарювання, але до 60-х рр. минулого сторіччя цей напрям стримувався труднощами їх отримання, нестійкістю, високою вартістю. Як окрему галузь у створенні та використанні нових біологічних агентів варто виділити іммобілізовані ферменти, які є стабільно функціонуючою системою, дія якої визначається правильним вибором ферменту, носія та способу іммобілізації. Переваги іммобілізованих ферментів порівняно з розчинними полягають у такому: стабільність і підвищена активність, утримання в об'ємі реактора, можливість повного і швидкого відділення цільових продуктів та організація безперервних процесів ферментації з багаторазовим використанням біологічного агента. Іммобілізовані ферменти відкривають нові можливості у створенні біологічних мікропристроїв для використання в аналітиці, перетворенні енергії та біоелектрокаталізі.

До біологічних об'єктів на даному етапі розвитку біотехнології відносять також рослинні та тваринні тканини, у тому числі гібриди, трансплантанти. Значна увага приділяється одержанню новітніх біологічних об'єктів – трансгенних клітин мікроорганізмів, рослин, тварин генноінженерними методами. Розроблені також нові методи, що дозволяють отримувати штучні клітини з використанням різних синтетичних і біологічних матеріалів (мембрани із заданими властивостями, ізотопи, магнітні матеріали, антитіла). Розробляються підходи щодо конструювання ферментів із заданими властивостями, які мають підвищену реакційну активність і стабільність. Таким чином, у біотехнологічних процесах можливе використання різних біологічних об'єктів з різним рівнем організації – від клітинної до молекулярної.

Субстрати й середовища, які використовуються в біотехнології, досить різноманітні, їхній спектр безперервно розширюється. З розвитком промислових процесів відбувається нагромадження нових видів відходів, які можуть бути знешкоджені й конвертовані в корисні продукти методами біотехнології. З одного боку, біотехнологічні промислові напрями стикаються з проблемою вичерпання традиційних видів

сировини, тому виникає необхідність у розширенні сировинної бази, з іншого, – збільшення об'ємів відходів, що накопичуються, зумовлює необхідність розробки нетрадиційних, у тому числі біотехнологічних, способів їх переробки.

Нині спостерігається посилення зацікавленості біотехнологів у природних відновлюваних ресурсах – продуктах фотосинтезу, біоресурсах світового океану. До складу середовищ для біотехнологічних процесів входять джерела вуглецю та енергії, а також мінеральні елементи й ростові фактори. Як джерела вуглецю та енергії в біотехнологічних процесах використовують переважно природні комплексні середовища невизначеного складу (відходи виробництв, продукти переробки рослинної сировини, компоненти стічних вод тощо), у яких окрім вуглецевих сполук містяться також мінеральні елементи й ростові фактори. До біотехнологічних субстратів належать також целюлоза, гідролізати полісахаридів і деревини. Останні 30 років для одержання білка використовують одноклітинних. Кислотний гідроліз деревини при 175–190 °C забезпечує вихід до 45–50 % редуруючих речовин; при жорсткіших режимах гідролізу ця величина зростає до 55–68 %. Останнім часом досить успішно почали використовувати гідролізати торфу, що дозволяє знизити вартість, наприклад, препаратів амінокислот у 4–5 разів. Мінеральні елементи, необхідні для росту біологічних агентів, і елементи, що входять до складу живильних середовищ, поділяються на макро- та мікроелементи. Серед макроелементів перше місце посідає азот, тому що потреби в ньому біологічних об'єктів на порядок перевищують потреби в інших елементах (фосфор, сірка, калій, магній). Азот зазвичай використовується мікроорганізмами у відновленій формі (сечовина, амоній чи їхні солі). Часто азот уводиться в комплексі з іншими макроелементами – фосфором, сіркою. Для цього як їх джерело використовують солі (сульфати або фосфати амонію). Однак для деяких продуцентів кращими є нітрати або органічні сполуки азоту. Істотне значення для забезпечення азотного харчування продуцента

має не лише вид, але й концентрація азоту в середовищі, тому що зміна співвідношення C : N, впливаючи на швидкість росту продуцента, метаболізм, викликає надсинтез низки цільових продуктів (амінокислот, полісахаридів тощо). Мінеральні елементи необхідні для росту будь-якого біологічного агента, але їх концентрація в середовищі залежно від біології біооб'єкта і завдань біотехнологічного процесу різна. Так, концентрація макроелементів у середовищі (K, Mg, P, S) зазвичай становить 10^{-3} – 10^{-4} М. Потреби в мікроелементах невеликі, їхня концентрація в середовищах істотно нижча – 10^{-6} – 10^{-8} М. Мікроелементи часто спеціально не вносять у середовище, оскільки їхні домішки в основних солях і воді забезпечують потреби продуцентів. Окремі продуценти через специфіку метаболізму або живильних потреб вимагають для росту наявності в середовищі ростових факторів (окремих амінокислот, вітамінів тощо). Окрім чистих індивідуальних речовин такої природи, на практиці часто використовують як ростові домішки кукурудзяний або дріжджовий екстракт, картопляний сік, екстракт проростків ячменя, зернових відходів і відходів молочної промисловості. Стимулююча дія даних ростових факторів багато в чому залежить від індивідуальних властивостей продуцента, складу основного середовища, умов ферментації та ін. Додавання ростових факторів може збільшити вихід цільового продукту, наприклад ферментів, у десятки разів.

Традиційно склад живильного середовища, оптимального для біотехнологічного процесу, визначається методом тривалого емпіричного підбору, під час якого на перших етапах визначається якісний і кількісний склад середовища. Було зроблено багато спроб обґрунтувати склад середовищ із позицій фізіології та біохімії продуцента, але, оскільки потреби в поживних речовинах видо- й навіть штамоспецифічні, то в кожному конкретному випадку необхідно підбирати оптимальний для конкретного продуцента склад середовища з урахуванням продуктивності та способів подальшої очистки. В останні 20–25 років усе частіше використовують математичний

метод планування експериментів, математичне моделювання біотехнологічних процесів, що дозволяє обґрунтовано підходити до конструювання поживних середовищ і робити їх економічно вигідними.

Апаратура. Питаннями технічного забезпечення біотехнологічних процесів займається біоінженерія. Технічно найскладнішим процесом ферментації є аеробний – глибинний, стерильний і безперервний етап (або з підживленням субстратом). Апарати для поверхневої й анаеробної ферментації менш складні та енергоємні. У сучасній літературі описано велику кількість біореакторів, що відрізняються за конструкцією, принципом дії та розмірами (від кількох літрів до кількох тисяч кубометрів). Численність методів культивування, різноманіття біологічних агентів зумовили безліч конструктивних рішень, які залежать від низки факторів: типу продуцента і середовища, технології та масштабів виробництва, а також цільового продукту тощо. Технічне оснащення біотехнології базується на загальних положеннях технічної біохімії та харчової технології, однак має специфіку.

Принципові відмінності біотехнологічних процесів від хімічних полягають у такому:

- чутливість біологічних агентів до фізико-механічних впливів;
- наявність міжфазового перенесення речовин (за типом "рідина – клітини", "газ – рідина – клітини");
- вимоги умов асептики;
- низькі швидкості перебігання багатьох процесів загалом;
- нестабільність цільових продуктів;
- піноутворення;
- складність механізмів регуляції росту і біосинтезу.

Розглянемо деякі типи ферментаційних апаратів. Апарати для анаеробних процесів досить прості й застосовуються при конверсії рослинної сировини, у тому числі рослинних відходів, а також промислових відходів. Зокрема, при метановому бродинні для одержання біогазу, а також у деяких інших

процесах (одержання ацетону, шампанських вин) використовують ферментаційні апарати (метанотанки). Ці апарати мають різну конструкцію (від простої вигрібної ями до складних – металевих конструкцій або залізобетонних споруд) і об'єми (від кількох до сотень кубометрів). Метанові установки обладнані системами подачі сировини й теплообмінних труб для стабілізації температури; відносно простим пристроєм перемішування для забезпечення гомогенного розподілу сировини та біомаси продуцента; газовим ковпаком і пристроєм перемінного об'єму (газгольдер) для збирання утвореного продукту – біогазу.

Конструкція апаратів для аеробної ферментації визначається типом ферментації й сировини. Апарати для аеробної поверхневої ферментації, які широко застосовуються у виробництві органічних кислот і ферментів, досить прості за конструкцією. Вони поділяються на рідкофазні та твердофазні. Поверхнева рідкофазна ферментація перебігає в бродильних вентильованих камерах, у яких на стелажах розміщені плоскі металеві кювети. У кювети наливають рідке поживне середовище, висота шару при цьому становить 80–150 мм, потім потоком повітря середовище контамінують спорами продуцента. У камері стабілізують вологість, температуру і швидкість подачі повітря. Після завершення процесу культуральна рідина зливається з кювет через вмонтовані у дно штуцери й надходить на обробку. При твердофазній ферментації процес також перебігає у вентильованих камерах, але замість кювет на стелажах розміщують лотки, у які насипають сипуче тверде середовище шаром 10–15 мм. Для кращої аерації середовища повітря, що подається в камеру, проходить через перфороване дно лотків.

Апарати для аеробної глибинної ферментації найскладніші як за конструкцією, так і в експлуатації. Головне завдання, що виникає при їх конструюванні, – забезпечення високої інтенсивності масо- й енергообміну клітин із середовищем. Масообмін визначається транспортом (перенесенням) кисню та інших біогенних елементів із середовища в мікробну клітину і

виведенням з неї продуктів обміну. Головним показником масообмінних характеристик ферментера служить коефіцієнт масопередачі кисню, оскільки кисень є основним лімітуючим фактором для аеробних ферментаційних процесів. Витрати кисню на утворення 1 кг біомаси залежно від типу джерела карбону і ступеню його відновлення можуть становити від 0,75 до 5,00 кг. Клітини здатні утилізувати кисень лише в розчиненому вигляді, тому необхідно постійно підтримувати його концентрацію в культурі на рівні, оптимальному для конкретного продуцента. При цьому швидкість надходження кисню до клітин має перевищувати швидкість його включення у клітини, а в навколоклітинному просторі не має виникати концентраційних ям. До того ж концентрація клітин і розчиненого субстрату мають бути рівномірними в усьому об'ємі ферментера. Тому перемішування є одним із основних факторів, що забезпечують необхідну гідродинамічну обстановку в апараті. При інтенсивному перемішуванні пухирці повітря подрібнюються і, диспергуючись, збільшують площу контакту фаз "середовище – клітина". Однак надмірне перемішування може викликати механічне ушкодження біологічних об'єктів.

На сьогодні розроблена і застосовується значна кількість різноманітних перемішувачів та аеруючих пристроїв, і класифікувати їх практично неможливо. Однією з удалих є спроба класифікації ферментаційних апаратів для аеробної глибинної ферментації за підведенням енергії (Вієстур та ін., 1986; 1987). Відповідно до цієї класифікації апарати такого типу поділяються на три групи: 1) до газової фази, 2) до рідкої фази, 3) комбіноване підведення.

Ферментери з підведенням енергії до газової фази (група ФГ).

Їхня загальна ознака – підведення енергії в апарат через газову фазу, яка є її носієм. Ферментери характеризуються досить простою конструкцією, високою експлуатаційною надійністю, але мають не дуже високі масообмінні характеристики (коефіцієнт масопередачі кисню менше 4 кг/м^3). Такі апарати є вертикальними ємностями, обладнаними газорозподільним

пристроєм одного з відомих типів. Барботажні газорозподільні пристрої зазвичай встановлюються в нижній частині апарата. Повітря, що подається через розподільну трубу, пройшовши через барботер, насичує киснем товщу середовища. Коефіцієнт масоперенесення кисню невисокий, 1–2 кг/м³ год.

Барботажні газорозподільні пристрої поділяються на:

1) Барботажно-колонні – у нижній частині корпусу такого апарата встановлюється перфорована пластина з діаметром отворів 0,5 см або сопловий ежектор з діаметром сопла 4 см.

2) Барботажно-ерліфтні апарати характеризуються наявністю всередині одного або кількох дифузорів ("склянок") або кількох перегородок для примусового розділення висхідних і низхідних потоків циркулюючої рідини; ці елементи розташовані рівномірно по перетину апарата або концентрично.

3) Газліфтні колонні ферментери складаються із двох колон різного діаметра, з'єднаних між собою; одна є барботажною колоною з висхідним потоком повітря, інша – циркуляційна, з низхідним потоком. Повітря вводиться в нижню зону апарата в барботажну колону; камера, що з'єднує колони у верхній частині апарата, утворює більшу поверхню контакту фаз; трубчастий апарат сконструйований за типом теплообмінних труб; взаємодія газу в трубі за високих швидкостей продувки інтенсивніша, ніж у великому об'ємі, тому масообмін відбувається інтенсивніше.

4) Апарати з плаваючою насадкою дозволяють інтенсифікувати масообмін за рахунок збільшення поверхні контакту фаз і турбулізації рідини при роботі з більшими швидкостями подачі газової та рідкої фаз. В апарат уведені секційні елементи у вигляді ґрат, обладнаних лопатевою насадкою; у центрі апарата є труба, крізь яку подається повітря, а рідка фаза надходить протитоком зверху. Газ, надходячи на лопатеву насадку, зазвичай з поліетилену, обертає її; це істотно збільшує поверхню контакту газової та рідкої фаз.

Ферментери зі введенням енергії рідкою фазою (група ФР) є найбільш складними за конструкцією та енергоємними, але забезпечують високі порівняно з групою ферментерів ФГ

значення коефіцієнта масопередачі кисню, понад $6 \text{ кг/м}^3 \text{ год}$. У таких апаратах уведення енергії здійснюється рідкою фазою, звичайно всмоктувальними мішалками або насосами; в останньому варіанті рідина вводиться в апарат через спеціальний пристрій (сопло, ежектор, диспергатор). Ці апарати також можна поділити на кілька типів:

1) Ферментери зі всмоктувальними мішалками не потребують спеціальних повітродувних машин, оскільки надходження в них повітря відбувається в результаті розрядження в повітряній камері мішалки, з'єднаної і з повітропроводом, і з рідиною, що відкидається лопатками мішалки.

2) В ежекційних ферментерах можлива рециркуляція газової фази, що економить субстрат, однак необхідною є наявність спеціальних насосів для перекачування газовмісного культурального середовища. Застосування ежекційного введення газових субстратів у ферментер може на порядок інтенсифікувати масообмін.

3) Струминні ферментери (із затопленим або падаючим струменем) обладнуються потужними насосами, які забирають культуральну рідину з нижньої частини апарата і через напірний трубопровід підводять потік до аеруючого пристрою. Струмień рідини під тиском вільно падає зверху і пронизує рідину до дна апарата. Відбувається інтенсивна турбулізація в перемішуванні рідини. Унизу рідина знову засмоктується насосом і знову подається в верх апарата, тобто виникає замкнений контур циркуляції. Недоліком таких апаратів є втрати енергії при перекачуванні рідини, труднощі проектування у зв'язку з відсутністю надійних методик розрахунку конструкцій і режимів роботи струминних і ежекційних пристроїв.

Ще одна група апаратів – з підведенням енергії газовою та рідкою фазами (група ФРГ). Їхніми основними конструктивними елементами є змішувальні пристрої всіх відомих типів, а також їх комбінація з насосами. Це можуть бути апарати з групою всмоктувальних мішалок і насосом для перекачування культуральної рідини та інші поєднання

змішувальних і аеруючих пристроїв. Коефіцієнт масоперенесення кисню в таких ферментерах може мати будь-які з відомих значень.

Перераховані типи апаратів були розроблені переважно під час ери антибіотиків і білка одноклітинних і застосовуються переважно в технічній мікробіології.

Прогрес у сфері отримання клітинних і рекомбінантних культур висуває спеціальні вимоги до біореакторів. На перший план виходять такі показники, як стабільність біологічних агентів, підвищені вимоги до асептики, лімітація зрізових умов при перемішуванні та ін. Однак багато з цих конструкцій залишаються експериментальними.

Продукти. Асортимент продуктів, які одержують у біотехнологічних процесах, надзвичайно широкий. За різноманітністю й об'ємами виробництва перше місце посідають продукти, які одержують у процесах, заснованих на життєдіяльності мікроорганізмів. Ці продукти поділяються на три основні групи:

1) біомаса, що є цільовим продуктом (білок одноклітинних) або використовується як біологічний агент (біометаногенез, бактеріальне вилугування металів);

2) первинні метаболіти – низькомолекулярні сполуки, необхідні для росту мікроорганізмів як будівельні блоки макромолекул, коферментів (амінокислоти, вітаміни, органічні кислоти);

3) вторинні метаболіти (ідіоліти) – сполуки, що не потрібні для росту мікроорганізмів і не пов'язані з ним (антибіотики, алкалоїди, гормони росту й токсини).

Серед продуктів мікробіологічного синтезу – величезна кількість різних біологічно активних сполук, у тому числі білкових і лікарських речовин, ферментів, а також енергоносії (біогаз, спирти) і мінеральні ресурси (метали), засоби для боротьби зі шкідниками сільськогосподарських культур (біоінсектициди) і біодобрива (табл. 3.1).

**Таблиця 3.1. Приклади мікроорганізмів,
що використовуються в промисловості
для отримання цільових продуктів**

Організм	Тип	Продукт
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Дріжджі	Пекарські дріжджі, вино, ель, сакє
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Бактерії	Йогурт
<i>Propionibacterium shermanii</i>	Бактерії	Швейцарський сир
<i>Gluconobacterium suboxidans</i>	Бактерії	Оцет
<i>Penicillium roquefortii</i>	Пліснява	Сири типу "рокфор"
<i>Aspergillus oryzae</i>	Пліснява	Сакє
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Дріжджі	Етанол
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Бактерії	Ацетон
<i>Xanthomonas campestris</i>	Бактерії	Полісахариди
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Бактерії	L-лізин
<i>Candida utilis</i>	Дріжджі	Мікробний протеїн
<i>Propionibacterium</i>	Бактерії	Вітамін В ₁₂
<i>Aspergillus oryzae</i>	Пліснява	Амілаза
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Дріжджі	Лактаза
<i>Saccharomycopsis lipolytica</i>	Дріжджі	Ліпаза
<i>Bacillus</i>	Бактерії	Протеази
<i>Endothia parasitica</i>	Пліснява	Сичужний фермент
<i>Leocanostoc mesenteroides</i>	Бактерії	Декстран
<i>Xanthomonas campestris</i>	Бактерії	Ксантан
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Пліснява	Пеніциліни
<i>Chehalosporium acremonium</i>	Пліснява	Цефалоспорини
<i>Rhizopus nigricans</i>	Пліснява	Трансформація стероїдів
Гібридоми	---	Моноклональні антитіла
Клітинні лінії ссавців	---	Інтерферон
<i>E. coli</i> (рекомбінантні штами)	Бактерії	Інсулін, гормон росту, інтерферон
<i>Blakeslea trispora</i>	Пліснява	β-каротин
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Дріжджі	Астаксантин
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Бактерії	Біоінсектициди
<i>Bacillus popilliae</i>	Бактерії	Біоінсектициди

У зв'язку з розвитком новітніх методів біотехнології (інженерної ензимології, клітинної та генної інженерії) спектр цільових продуктів невпинно зростає. Серед них усе більшого значення набувають засоби діагностики й лікування

(гібридоми, моноклональні антитіла, вакцини, сироватки, гормони, модифіковані антибіотики).

Запитання для самоконтролю

1. Наведіть недоліки та переваги біотехнологічних виробництв порівняно з хімічними.
2. Що таке USP та DSP?
3. Що відбувається на доферментаційній стадії біотехнологічного виробництва?
4. У якій фазі розвитку продуцентів мікробів створюються біотехнологічні продукти?
5. Якими двома способами здійснюють контроль за розмноженням мікроорганізмів-продуцентів в умовах безперервної ферментації?
6. Наведіть фактори, що впливають на вибір методів виділення та концентрування біотехнологічних продуктів.
7. Наведіть переваги застосування в біотехнології змішаних культур.
8. Перерахуйте переваги іммобілізованих ферментів.
9. Що зазвичай використовують як середовище в біотехнології?
10. Апарати для якої ферментації є технічно найскладнішими?
11. Опишіть відмінності хімічних і біотехнологічних процесів виробництва.
12. Чим визначається конструкція апаратів для ферментації?
13. Який критерій є лімітуючим для аеробної ферментації?
14. Які умови вдається реалізувати при перемішуванні ферментаційної суміші? Які недоліки цього процесу?
15. Наведіть приклад ферментера з підведенням енергії до газової фази.
16. Поясніть, що таке коефіцієнт масопередачі кисню і для чого він потрібен.
17. Поясніть, чим ферментери групи ФГ відрізняються від групи ФР.
18. За допомогою яких мікроорганізмів отримують вітамін B₁₂, сичужний фермент, амілазу?

3.2. Методи отримання, очищення та формуляції цільового продукту

I. Відділення біомаси. Першим етапом у процесі очищення цільового продукту є етап сепарації – розділення культуральної рідини та клітинної біомаси. У деяких випадках сепарації передують спеціальна обробка реакційної суміші, що сприяє ефективнішому відділенню біомаси та стабілізації продукту. Для відділення біомаси застосовують різні методи сепарації.

Флотація. Метод застосовують у випадку, коли клітини продуцента через низьку змочуваність накопичуються в поверхневих шарах вмісту біореактора. Особливі пристрої (флотатори) різної конструкції видаляють піну, що утворюється при культивуванні, разом із клітинами в ній. Підвищення ефективності відбору біомаси досягається шляхом спінування рідини з подальшим відділенням її верхнього шару механічним способом. Перевагами методу є його економічність, висока продуктивність і можливість використання в безперервних процесах.

Фільтрування – це розділення твердої та рідкої фаз суспензії при її пропусканні через пористу перегородку. Кінцева мета фільтрування – одержання твердої або рідкої фази (коли одна з них належить до відходів) або одночасне одержання обох фаз. Фільтрування – гідродинамічний процес, швидкість якого прямо пропорційна різниці тисків, яка виникає по обидва боки від фільтрувальної перегородки, й обернено пропорційна опору, якого зазнає рідина при проходженні через пори перегородки та шар осаду, що утворився.

На процес фільтрування впливають фактори, які можна поділити на дві групи.

1. Макрофактори – різниця тисків, товщина шару осаду, в'язкість рідкої фази та ін. Ці фактори відомі й контролюються за допомогою приладів.

2. Мікрофактори – розмір і форма часток осаду та пор фільтрувальної перегородки, товщина подвійного електричного шару на поверхні часток та ін. Ці фактори менш вивчені, їх характеризують лише непрямими методами. Саме мікрофактори

здійснюють вирішальний вплив на процес фільтрування й ускладнюють його масштабування.

При фільтруванні культуральної рідини утворюються здебільшого драглисті пластівчасті або дрібнозернисті осади, що характеризуються більшим опором. Середня швидкість фільтрації при цьому становить лише 50 л/м² за годину. Для збільшення швидкості фільтрування зазвичай використовують два прийоми:

1. Попередня обробка суспензій.
2. Застосування допоміжних фільтрувальних матеріалів.

Попередня обробка культуральної рідини дозволяє повніше перевести цільовий продукт у рідку або тверду фазу, забезпечити краще розділення фаз і одержати продукт, придатний для подальшого очищення та виділення. У результаті попередньої обробки відбувається коагуляція завислих часток. Найпоширенішими є такі способи попередньої обробки:

1. Кислотна коагуляція (застосовується для виділення антибіотиків, стійких до низьких рН).
2. Обробка електролітами.
3. Теплова коагуляція (застосовується у випадках, коли продукт стійкий до нагрівання при 70–80 °С).
4. Утворення наповнювачів при додаванні хімічних агентів. Як допоміжні фільтрувальні матеріали використовують фільтрувальні порошки, що додають до фільтрованої рідини як наповнювачі або попередньо наносять на робочу поверхню фільтра у вигляді ґрунтового шару.

Різноманітні фільтруючі системи (барабанні, стрічкові, тарілчасті, мембранні фільтри, карусельні вакуум-фільтри, фільтри-преси) засновані на однаковому принципі – затримці біомаси на пористій фільтруючій перегородці. Недоліком способу є налипання клітин на фільтр, шар яких знижує швидкість протікання рідини під час фільтрування. Для фільтрів безперервної дії передбачаються системи автоматичного очищення від біомаси, що забиває пори. Біомаса може видалятися з поверхні фільтрів стрімким потоком стисненого повітря або спеціальними ножами. Існують також фільтри для багато- або одноразового періодичного використання. Наприклад, мембранні (зокрема тefлонові) фільтри дозволяють

фільтрувати дуже розведені клітинні суспензії. Однак проблемою їх використання є швидка закупорка пор клітинами, білками та іншими колоїдними частками. Прийоми механічного видалення матеріалу, що забиває фільтри, при цьому способі фільтрації не придатні, оскільки ушкоджують мембрани. Для подолання ускладнень такого роду мембранні фільтри покривають гідрофільним шаром, що перешкоджає контакту білків (колоїдів) з поверхнею фільтра, або обробляють їх гідролітичними ферментами.

Центрифугування – це розділення неоднорідних систем під дією поля відцентрових сил. Для центрифугування застосовують центрифуги різних конструкцій. Центрифуги, що мають високий фактор розділення й оснащені тарілчастим барабаном, називають сепараторами. У мікробіологічній промисловості вони є одним з найпоширеніших типів центрифуг. Сепаратори дозволяють сконцентрувати осад до вологості 60–90 %. Також існують спеціальні герметичні сепаратори, що дозволяють проводити процес сепарування у автоматизованому режимі, оптимально підбраному для специфічних умов конкретних культуральних рідин. Сфери застосування центрифугування такі:

1. Отримання біомаси з культуральної рідини (дріжджі, бактерії, гриби).

2. Відділення різноманітних цільових продуктів мікробіологічного синтезу (антибіотики, ферменти, вітаміни та ін.), переведених попередньо у тверду фазу.

3. Розділення емульсій, що утворюються при екстракції.

Недоліки центрифугування:

1. Складність конструкції, висока енергоємність і вартість.

2. Складність експлуатації (ненадійність, вібрація, шум тощо).

3. Вплив на клітини відцентрової сили, нагрівання, труднощі герметизації та забезпечення асептичних умов.

Основні переваги центрифугування й сепарування – висока продуктивність і високий ступінь концентрування, що дозволяють успішно конкурувати з іншими способами отримання й концентрування як у промислових, так і в

лабораторних умовах. Цей спосіб дорожчий, ніж фільтрування, тому він застосовується, якщо:

- а) суспензія фільтрується занадто повільно;
- б) виникає необхідність максимального звільнення культуральної рідини від часток, що містяться в ній;
- в) необхідно забезпечити безперервний процес сепарації, коли фільтри розраховані на періодичну дію.

Центрифугування та фільтрація в деяких біотехнологічних процесах здійснюються комбіновано, тобто застосовуються фільтраційні центрифуги, у яких розділення рідкої та твердої фаз засновано на двох процесах – фільтруванні й центрифугуванні. Досить широко використовуються прийоми, коли розділення забезпечується лише відцентровою силою. Найперспективнішими тут є центрифуги-сепаратори, у яких відокремлювана біомаса осідає на стінках обертового циліндра або спеціальних тарілчастих вставках.

II. Методи руйнування клітин. Руйнування клітин проводиться фізичними, хімічними й ферментативними методами. Найбільше промислове значення мають фізичні способи дезінтеграції:

- 1) ультразвуком;
- 2) лопатковими або вібраційними дезінтеграторами (зазвичай використовуються в пілотних і промислових установках);
- 3) струшуванням зі скляними намистинами;
- 4) продавлюванням через вузькі отвори під високим тиском;
- 5) роздавлюванням замороженої маси;
- 6) розтиранням у спеціальних ступках;
- 7) за допомогою осмотичного шоку;
- 8) багаторазовим заморожуванням і таненням;
- 9) стисканням клітинної суспензії з подальшим різким зниженням тиску (декомпресією).

Фізичні способи дезінтеграції відрізняються більшою економністю порівняно з іншими методами, однак характеризуються відсутністю вираженої специфічності, унаслідок чого обробка може негативно впливати на якість цільового продукту. М'яке вибіркве руйнування клітинної

стілки забезпечується застосуванням хімічних і ферментативних методів. Наприклад, бактеріальні клітини руйнуються лізоцимом за наявності ЕДТА (етилендіамінтетраоцтової кислоти), а клітинні стінки дріжджів – зимоліазою равлика або ферментами грибів чи актиноміцетів. Клітинні стінки мікроорганізмів можуть бути зруйновані шляхом обробки толуолом або бутанолом. Елективний лізис клітин викликається також дією деяких антибіотиків: поліміксину, новобіопіну, ністатину та ін. Аналогічні результати зумовлює обробка клітин деякими поверхнево-активними речовинами.

Після дезінтеграції клітин необхідно позбавитися їхніх уламків, для чого використовують ті самі методи, що й при сепарації, тобто центрифугування або фільтрацію. Проте з огляду на структуру оброблюваного матеріалу в цьому випадку доводиться застосовувати більш швидкісні центрифуги та фільтри з меншим діаметром пор (у більшості випадків використовують мембранні фільтри). Зазвичай у більшості біотехнологічних процесів уламки клітин викидають як відходи, але можливим є також їх спеціальне одержання у вигляді цільового продукту або його джерела.

III. Отримання й очищення цільових продуктів. Отримання цільового продукту з культуральної рідини або гомогенату зруйнованих клітин, одержаного в результаті процесів дезінтеграції, здійснюється шляхом осадження, екстракції або із застосуванням різних методів адсорбції.

Осадження (седиментація) – це процес розшарування дисперсних систем під дією сили тяжіння й відділення дисперсної фази у вигляді осаду. Найпростіший приклад седиментації – відстоювання – застосовують у таких випадках:

- 1) при діаметрі часток більше 3 мкм, коли броунівський рух істотно не впливає на процес відстоювання;
- 2) при отриманні стабільних продуктів, коли фактор часу не має вирішального значення;
- 3) за нижчих порівняно з іншими методами витрат;

4) в особливих випадках, коли необхідно розділити частки на фракції за розміром або щільністю на підставі різних швидкостей їх осадження;

5) якщо необхідно попередньо розділити суспензію на дві фракції – осад і надосадову рідину, які надалі можна обробляти на різному обладнанні.

Швидкість осадження біомаси з культуральної рідини незначна і становить близько 10^{-6} – 10^{-7} м/с. Для прискорення процесу осадження застосовують:

1) коагулянти – речовини, що переводять завислі частки в агрегатно-нестійкий стан;

2) флокулянти – речовини, що сприяють руйнуванню колоїдних структур і утворенню великих пластівців.

Як коагулянти застосовують желатин, рибний клей, казеїн, а як флокулянти – метилцелюлозу, пектин, альгінат натрію та ін.

Осадження розчинених речовин здійснюється фізичними методами – нагріванням, розведенням або концентруванням, охолодженням розчину чи хімічними впливами, що забезпечують переведення розчиненої речовини в малорозчинний стан. Зрозуміло, що залежно від цілей і властивостей продукту використовують той чи інший метод.

Екстракція – процес розділення суміші твердих і рідких речовин за допомогою вибіркового (селективного) розчинників (екстрагентів). Фізична сутність екстракції полягає в переході компонента, що екстрагується, з однієї фази (рідкої чи твердої) у фазу рідкого екстрагента при їх взаємному контакті. Компоненти, що екстрагуються, переходять із вихідного розчину в розчинник унаслідок різниці концентрацій, тому процес належить до дифузійних. Екстракція зазвичай проводиться у двофазних системах "тверде тіло – рідина" або "рідина – рідина". Сфера застосування екстракції: виділення й очищення антибіотиків, вітамінів, амінокислот.

Переваги методу: 1) низькі витрати; 2) висока швидкість екстракційних процесів.

Недоліки: використання шкідливих, вибухонебезпечних органічних розчинників.

Екстракція поділяється на твердо-рідкофазну (при якій продукт із твердої фази переходить у рідку) і рідко-рідкофазну (при якій продукт із однієї рідкої фази переходить у іншу, також рідку фазу). Твердо-рідкофазна екстракція може зводитися до простої обробки твердого зразка водою або органічним розчинником з метою екстракції з нього розчинних сполук. Досить широко застосовуються різноманітні органічні розчинники, зокрема ацетон, який забезпечує ефективне переведення в розчин деяких ліпідних і білкових компонентів клітин. При рідко-рідкофазній екстракції також використовують різні органічні розчинники – алкілфеноли, ефіри, галогеніди, гексан, хлороформ та ін.

Ефективність екстракції можна істотно підвищити:

- 1) багаторазовою обробкою екстрагуючим агентом;
- 2) підбором оптимального розчинника;
- 3) підігрівом екстрагуючого агента чи екстрагуючої рідини, що містить продукт;
- 4) зниженням тиску в апараті для екстракції, що забезпечує досить ефективну екстракцію за відносно низької температури (останнє знижує витрати та зменшує ризик інактивації продукту).

Майже повністю уникнути інактивації дозволяє екстрагування на холоді, тобто кріоекстракція. При цьому вирівнюються відмінності між твердим субстратом і культуральною рідиною, оскільки обидва перебувають у замороженому стані (в одній фазі). Кріоекстракція проводиться з використанням розчинників, температура кипіння яких низька і які за кімнатної температури перебувають у газоподібному стані. Кріоекстракцію можна застосовувати в поєднанні з кріоконсервацією клітин. Клітинна біомаса може тривалий час зберігати властивості за умов глибокого заморожування, а потім з неї може бути екстрагований цільовий продукт. У деяких випадках екстрагуючий агент

може перебувати не в рідкому, а в газоподібному стані (при рідко-газофазній або твердо-газофазній екстракції).

Хроматографія, що поділяє за розмірами (гель-фільтрація). Відмінності в розмірах молекул є основною властивістю, на якій ґрунтується метод гелі-фільтрації. Механізм гелі-фільтрації був вивчений ще в середині 50-х рр. ХХ ст. Метод набув популярності завдяки м'якому механізму розділення, що дозволяє зберігати біологічну активність, і належному макропористому сорбенту (сефадексу), який майже відразу стали випускати в промислових масштабах. Препаративна гелі-фільтрація може бути умовно поділена на буферний обмін і фракціонування. Буферний обмін підходить для ситуацій, коли компоненти з низькою молекулярною масою (зазвичай молекули солі) обмінюються на іншу буферну речовину (тобто для кондиціювання до початку наступної стадії) або розчинник. При фракціонуванні потрібна розчинена речовина має бути відділена від інших розчинених речовин подібного розміру, що зумовлює жорсткіші вимоги до вибору хроматографічного сорбенту й умов фракціонування. Отже, сефадекси – це поперечно зшиті декстриани із заданими розмірами пор. Зшиті ланцюги декстрану тривуглецевими містками за допомогою епіхлоргідрину. Чим більше поперечних зшивок, тим менші розміри пор. Отриманий таким способом гелі відіграє роль молекулярного сита. При пропусканні розчину із сумішшю речовин через колонку, наповнену гідратованими гранулами сефадексу, великі частки, розмір яких перевищує розмір пор сефадексу, будуть рухатися швидко. Дрібні ж молекули, наприклад солі, рухатимуться повільно, оскільки в процесі руху проникатимуть усередину гранул.

Існують різні марки сефадексів, що відрізняються розміром пор (G-10, 15, 25, 50, 75 тощо). Чим менший номер, тим більшу кількість поперечних зшивок містить молекула і тим менше води поглинає гранула при набряканні. Зі збільшенням номера марки сефадексу збільшуються пори гранул і розширюються межі молекулярної маси речовин, здатних проникати всередину гранул, а отже, здатних до розділення. Кожна марка

сефадексу випускається з різною величиною частинок: надтонкий, тонкий, середній і грубий. Зазвичай в аналітичній роботі використовуються надтонкий і тонкий, а в препаративній – середній і грубий.

Крім сефадексів, для гель-фільтрації білків використовують сополімери акриламід з біс-акриламідом, які одержали назву *біогелі* (P-2, P-4, P-6 тощо), і сефарозу, поперечно зшити агарозою (агароза – це нейтральний компонент агару). Усі вони розділяють білки за розміром молекул, як і сефадекси. Основна проблема, пов'язана з використанням сефадексу і поліакриламід, полягає у м'якості їхніх гранул. Навіть дуже слабкий тиск, що виникає в колонці під час хроматографії, викликає деформацію гранул. Цих недоліків позбавлені сефакрили – декстриани, що містять додаткові поперечні зв'язки, утворені біс-акриламідом (табл. 3.2).

Таблиця 3.2. Сфери застосування гелів

Фірмова назва гелю, виробник	Тип гелю	Границі поділу за відносною молекулярною масою (для глобулярних білків), Да
Сефадекс, <i>GE Healthcare</i>		
G-10*	Декстран	до 700
G-15	"	до 1500
G-25	"	1000-5000
G-50	"	1500-30000
G-75	"	3000-70000
G-100	"	4000-150000
G-150	"	5000-400000
G-200	"	5000-800000
Біогель, <i>Bio-Rad</i>		
P-2	Поліакриламід	200-26000
P-4	"	500-4000
P-6	"	1000-5000
P-10	"	5000-17000
P-30	"	20000-50000
P-60	"	30000-70000
P-100	"	40000-100000

Закінчення табл. 3.2

Фірмова назва гелю, виробник	Тип гелю	Границі поділу за відотною молекулярною масою (для глобулярних білків), Да
P-150	"	50000-150000
P-200	"	80000-300000
P-300	"	100000-400000
Сефароза, GE Healthcare		
6B	Агароза	до 2×10^6
4B	"	$300000 - 20 \times 10^6$
2B	"	$2 \times 10^6 - 25 \times 10^6$
CL-6B	Поперечно зшита агароза	$10000 - 4 \times 10^6$
CL-4B	"	$60000 - 20 \times 10^6$
CL-2B	"	$70000 - 40 \times 10^6$
Сефакрил, GE Healthcare		
S-100	Декстран/біс-акриламід	$1 \times 10^3 - 1 \times 10^5$
S-200	"	$5 \times 10^3 - 2.5 \times 10^5$
S-300	"	$1 \times 10^4 - 1.5 \times 10^6$
S-400	"	$2 \times 10^4 - 8 \times 10^6$
S-500	"	$4 \times 10^4 - 2 \times 10^7$

* Гелі сефадексу не рекомендується використовувати на нижній межі зазначеного діапазону

Ступінь розширення хроматографічної зони також пов'язаний з розміром часток носія, а ступінь зниження роздільної здатності при зростанні швидкості потоку буде меншим для сорбентів з малим розміром часток (унаслідок меншої довжини дифузійного шляху).

Швидкість потоку – перший із двох факторів, що визначають продуктивність; другий фактор – навантаження зразка. На відміну від адсорбційних методів, межа концентрації зразка при гель-фільтрації задається лише фізико-хімічними обмеженнями та високими концентраціями розчинених речовин, наприклад до 70 мг/мл для сироваткового бичачого альбуміну (при перевищенні цієї концентрації шар зразка стає занадто в'язким і

гідродинамічно нестійким). Це означає, що об'єм зразка є чинником, який визначає продуктивність. Однак збільшення об'єму зразка зумовлює розширення його хроматографічної зони (оскільки розчинена речовина не адсорбується), що спричиняє зниження роздільної здатності. У промисловості зазвичай нехтують нижньою межею хроматографічної зони сорбентів з малим розміром часток, якщо обробляються значні об'єми зразків, і в цьому випадку оптимальними є хроматографічні сорбенти із середнім розміром часток і великим розміром пор. Роздільна здатність може підтримуватися постійною шляхом збільшення об'єму сорбенту пропорційно збільшенню об'єму зразка (тобто на графіку залежності роздільної здатності від об'єму зразка, вираженого у відсотках від об'єму сорбенту, усі дані лягають на одну лінію). Таким чином, хроматографія зразка великого об'єму за один прийом за низької швидкості або розділення зразка і хроматографія в кілька прийомів за високої швидкості зумовляють розширення зони й, відповідно, нижчу роздільну здатність (але з різних причин). Тому вибирають деякий оптимальний варіант за об'ємом зразка і кількістю циклів для обробки заданого об'єму розчиненого цільового продукту (РЦП). Цей оптимум нанесеного зразка може бути розрахований: він перебуває в інтервалі 2–6 % від об'єму колонки на один цикл і залежить від початкової роздільної здатності, необхідної чистоти й видобутку.

Продуктивність при гель-фільтрації визначається максимальним об'ємом зразка, його максимальною концентрацією і тривалістю циклу. Максимально прийнятний об'єм зразка пропорційний об'єму сорбенту, а максимальна концентрація зразка залежить від його в'язкості. Тривалість циклу може бути невеликою, як у випадку адсорбційних процесів, оскільки надмірне розширення смуги не може бути компенсоване регулюванням відстані між зонами білків за допомогою умов хроматографування (тобто вибірковість для кожної колонки – величина стала). Для хроматографії певного об'єму за певний час є оптимальне поєднання об'єму зразка і тривалості циклу. Розрахунки, підтверджені експериментами на Sephacryl, доводять загальне правило: об'єм зразка має

дорівнювати 2–6 % від об'єму колонки для кожного циклу за тривалості кожного з циклів від 5 до 1 год, відповідно. На продуктивність виражено впливає ефективність вилучення, найвища продуктивність спостерігалася при навантаженні зразка, що становить 3 % об'єму сорбенту (як і очікувалося, менше навантаження необхідне для досягнення більшої чистоти, тобто роздільної здатності).

Ефекти в'язкості виявлялися за концентрацій зразків, що перевищували 75 г білка на 1 л для альбумінів. На гел'єфільтраційній колонці об'ємом 100 л за кожний цикл може бути очищено 300 г білка. Тривалість циклу змінюється залежно від розміру часток сорбенту і коефіцієнта дифузії розчиненої речовини. Однак при використанні сорбенту з розміром часток 30 мкм можна очікувати продуктивності близько 1 г на 1 л хроматографічного сорбенту за 1 год. При знесолюванні об'єм зразка може бути дуже великим і теоретично дорівнювати об'єму пор хроматографічного сорбенту, оскільки високомолекулярний РЦП буде елююватися в "мертвому" об'ємі, а домішки з низькою молекулярною масою – в об'ємі колонки (у тому випадку, якщо буде підібраний відповідний хроматографічний сорбент). Таким чином, об'єм зразка 30–40 % від об'єму колонки може бути прийнятним для знесолювання, і максимум 3 кг білка можуть бути очищені за кожний цикл на колонці об'ємом 100 л. Для хроматографічного гелю з меншими порами ця цифра ймовірно становитиме близько 5 кг очищеного білка за один цикл. Наприклад, при видаленні етанолу із сироваткового альбуміну людини продуктивність становить 9 % на 121 л розчину альбуміну, очищеного від етанолу впродовж 13,5 хв на колонці з 75 л Sephafex G-25 Coarse. Це відповідає продуктивності 64 г на 1 л хроматографічного сорбенту за 1 год або 1,44 кг за цикл при об'ємі зразку 16 % від об'єму сорбенту.

Розділення білків шляхом адсорбції. Білки зазвичай вибірково адсорбуються на твердих фазах різних типів. Тому адсорбційні методи, особливо хроматографія на колонках, широко використовуються для розділення білків. Застосування цих методів дозволяє одержати найбільший ступінь очищення білків. Адсорбційна препаративна хроматографія білків

поділяється на: 1) іонообмінну; 2) гідрофобну; 3) афінну; 4) хроматографію на обернених фазах.

Іонообмінна хроматографія. Заряди або заряджені зони на поверхні розчиненої речовини можуть притягатися протилежно зарядженими ділянками, зв'язаними із хроматографічною матрицею за умови, що іонна сила буфера буде достатньо низькою. Така взаємодія є основним явищем у іонообмінній хроматографії. Хроматографічним сорбентом для іонообмінної хроматографії може бути сорбент для гель-фільтрації, до якого "пришиті" заряджені групи за допомогою спейсеру. Елюція зазвичай проводиться шляхом збільшення іонної сили буфера, що буде конкурувати зі зв'язаними речовинами за "пришиті" до матриці заряджені ділянки. Зміна іонної сили може бути лінійною (градієнтна елюція) або ступінчастою (ступінчаста елюція). Елюція зі зміною іонної сили підсилює вплив на зони розчиненої речовини, на відміну від ізократичної елюції, за якої іонна сила підтримується постійною. Зміна pH або заряду розчиненої речовини також буде сприяти елюції.

Іонообмінні сорбенти. В іонообмінній хроматографії використовують два принципово різні види сорбентів. Найпоширеніші – аніонообмінні – сорбенти мають позитивно заряджені (часто амінні) групи, "пришиті" до хроматографічної матриці. Вони зв'язують полінуклеотиди (завдяки негативно зарядженим фосфатним групам), а також білки та пептиди при pH, що перевищують їхню ізоелектричну точку, у якій ці розчинені речовини набувають негативного заряду. Якщо заряджені групи на аніонообміннику титруються, наприклад вторинні чи третинні аміни типу DEAE (диетилоаміноетил), то вважають, що аніонообмінник слабкий; якщо ж заряд іонообмінника не залежить від pH (у межах інтервалу, що зазвичай використовується), як у випадку QAE (четвертинний аміноетил), то вважають, що аніонообмінник сильний. Отже, класифікація аніонообмінників на слабкі та сильні не має нічого спільного із силою взаємодії.

Інший тип іонообмінників – катіонообмінники, негативний заряд яких притягує білки й пептиди в буфері з pH нижче їхньої ізоелектричної точки. Для катіонообмінників звичайними

зарядженими групами є CM (карбоксиметил), які утворюють слабкий катіонообмінник, і SP (сульфопропіл), що формують сильний катіонообмінник. Для поліпшення іонного обміну великих макромолекул заряджена група зазвичай "пришивається" до матриці через проміжний спейсер.

Вибіркова здатність різних позитивно і негативно заряджених лігандів зазвичай не дуже відрізняється, тому найдієвіший спосіб поліпшити вибірковість полягає у зміні заряду розчиненого цільового продукту (РЦП), тобто шляхом зміни рН розчину. Протилежний процес відбувається у випадку хроматографування білків з низькою ізоелектричною точкою на катіонообміннику. Проте не існує однозначної залежності між чистим зарядом і часом утримання в іонообмінній хроматографії білків унаслідок складного розподілу зарядів по поверхні молекули. Зміна заряду зі зміною рН особливо широко використовується при ізоелектро- або хроматофокусуванні. Швидкість, з якою змінюється рН рухомої фази (тобто градієнт), зумовлює зміну заряду розчинених речовин і, отже, зміну розподільної здатності. Розподільна здатність є одним з параметрів, які найчастіше використовуються для регулювання розділення в адсорбційній хроматографії, а найкращі результати одержують при часі утримання зразка, за який встигає пройти об'єм буферу, рівний 5–20 об'ємам колонки. Один зі шляхів поліпшення розділення полягає в тому, щоб зменшити нахил градієнта, тобто збільшити кількість об'ємів колонки в градієнті й/або зменшити інтервал градієнта.

Інший спосіб полягає в корекції значення рН. У цьому випадку найкращим рішенням буде оптимізувати рівень рН (за умови, що рН не було оптимізовано для такого розділення в першу чергу) або вибрати інше хроматографічне середовище.

Третім важливим параметром є навантаження зразка. Значне навантаження зразка займе велику зону в сорбенті, що викличе розширення піка. За умови надмірного навантаження об'єм елюції буде збільшуватися зі збільшенням навантаження, що спричинить помітний хвіст у піку. Це призведе до забруднення наступних піків. Вплив надмірного

навантаження можна усунути шляхом обмеження його величини приблизно до $1/3$ максимального зв'язування.

За цих умов концентрація РЦП, адсорбованого на колонці, буде змінюватися лінійно зі зміною концентрації РЦП у рухомій фазі (робота в таких умовах називається хроматографією лінійної елюції). Піки будуть досить симетричними, розширення зони зменшуватиметься зі збільшенням завантаження, що викличе підвищення розподільної здатності. Вплив швидкості потоку i , як показано для гель-фільтрації, відносно розширення зони піка внаслідок його високої швидкості є незначним при роботі зі значним навантаженням зразка.

Таким чином, оптимізація іонообмінної хроматографії включає: оптимізацію першого параметра, тобто вибір рН для досягнення найоптимальнішої вибіркової (одержання потрібної розчиненої речовини в градієнті знижує ризик забруднення, але підвищує ризик витіснення цієї речовини речовинами з вищими константами асоціації). Наступним параметром, який необхідно оптимізувати, є градієнт іонної сили рухомої фази, що має становити від 5 до 20 об'ємів колонки для забезпечення максимальної роздільної здатності. І третє – варто використовувати цю роздільну здатність для збільшення навантаження зразка до межі розділення, прийнятної з погляду чистоти, продуктивності та надійності процесу.

Градієнтна елюція іноді може бути нездійсненною для великомасштабних процесів. У такому випадку потрібно перенести оптимізовані градієнтні умови на ряд стадій і спочатку елювати розчинені речовини, які швидко втрачають активність або денатурують, потім елювати продукт і на кінцевому етапі десорбувати всі міцно зв'язані розчинені речовини на стадії відмивання. Розділення на стадії елювання може бути не таким ефективним, як на градієнтній стадії, однак воно може бути достатнім для одержання продукту необхідної чистоти.

Афінна хроматографія. Найвищий ступінь специфічності досягається завдяки сукупності кількох додаткових механізмів взаємодії, які працюють одночасно і на специфічних ділянках. Це є основою афінної хроматографії, яка потребує не лише

наявності певних поверхневих властивостей хроматографічного сорбенту, але також цілком певного місця дії цих властивостей. Не існує універсальних афінних середовищ, кожне середовище розроблене для конкретної речовини або класу речовин, що потребують очищення. Проте мають бути підібрані такі умови адсорбції, що сприятимуть взаємодії, незважаючи на те, що елюція може здійснюватися або шляхом конкуренції з молекулами ліганду, або шляхом зміни складу рухомої фази (наприклад концентрації протонів у ній) з метою модифікації властивостей розчиненої речовини або ж ліганду. Також не варто розраховувати на те, що за допомогою афінної хроматографії можна розрізняти молекули, які мало відрізняються в ділянках не за місцем зв'язування, якщо тільки ця відмінність не впливає на місце зв'язування.

Спорідненість між матрицею та розчиненими речовинами вперше була помічена при вибірковій адсорбції α -амілази на нерозчинному крохмалі у 1910 р. З розвитком хімії зв'язування сполук можливість цілеспрямованого виробництва афінних середовищ зробила афінну хроматографію цінним знаряддям розділення речовин. Це також дозволило "пришивати" афінні ліганди, що характеризуються більшою чи меншою вибірковістю в молекулярному процесі впізнавання, що пояснює наявність широкого спектра лігандів сьогодні. Таким чином, термін *афінна хроматографія* набув широкого значення. Хоча деякі автори обмежують застосування терміна лише описом біологічно функціональних взаємодій, ми будемо використовувати його ширше, включаючи будь-яку взаємодію, зумовлену наявністю специфічних груп на поверхні (поодинокі іонів або гідрофобних груп). Можна досягти дуже високих ступенів очищення, наприклад 1000-кратних, з високим виходом активного матеріалу.

У процесі пошуку нових вибірових методів розділення зросла зацікавленість у методах, заснованих на спорідненості. Це зумовлено успіхами в молекулярній біології та комбінаторній хімії, які забезпечили методологію для одержання широкого спектра лігандів при помірних витратах. Крім того, дослідження залежностей структура – функція

показали, що можна значно зменшити розмір, наприклад лігандів білків, що, у свою чергу, забезпечить одержання хімічно стійкіших лігандів.

Афінні сорбенти. Афінні сорбенти складаються із макропористої хроматографічної матриці, до якої "пришивають" або приєднують специфічні ліганди. Розмір пор матриці має бути достатньо великим, щоб забезпечити місце для дуже великих лігандів і легкий доступ до взаємодіючої молекули.

За специфічністю взаємодії ліганди можна поділити на дві групи, тобто на групоспецифічні й моноспецифічні. Групоспецифічні ліганди включають білки А та G для очищення імуноглобулінів, лектини – для очищення глікопротеїнів, барвники – для очищення НАД- і НАДФ-залежних ферментів, полінуклеотиди – для очищення олігонуклеотидів, що містять комплементарні послідовності, тощо. Іншими типами лігандів, які можуть бути включені до цього класу, є хелатуючі групи (що утворюють комплексні сполуки), наприклад імінооцтова кислота, що використовуються для сорбції іонів металів, які, у свою чергу, притягують певні амінокислоти, що містяться на поверхні, наприклад гістидин і цистеїн. Цей метод називається *афінною хроматографією з іммобілізованим металом (IMAC)*.

Моноспецифічні ліганди зв'язуються з дуже малою кількістю розчинених речовин. Як приклад можна навести лізин, який зв'язує плазміноген, і біотин, що зв'язує авідин. Однак такий зв'язок може бути дуже міцним і потребувати досить жорстких умов для елюції розчиненої речовини. Антитіла мають дуже високу специфічність і є дуже популярними лігандами. Цей тип афінного сорбенту називається *імуносорбентом*. Можливими є 1000-кратні показники одностадійного очищення при більш ніж 90 % видобутку. На сьогодні існують спроби зменшити розмір ліганду імуносорбенту й увести лише активний фрагмент. Однак, імовірно, є межа такого зменшення, зумовлена необхідністю збереження впорядкованої структури ліганду, яка може бути важливою для виявлення належної адсорбційної здатності. Такий ефект можна помітити при 100-кратному збільшенні константи асоціації сорбенту із синтетичним лігандом, що спеціально розроблений для імітації рецептора

білка. Ці типи афінних сорбентів можуть витримувати жорстке хімічне й термічне очищення. Однак низька константа асоціації може бути несприятливою при підготовчому очищенні з розведеного РЦП.

Належний дизайн лігандів може гарантувати їхню оптимальну орієнтацію, наприклад за допомогою методів генної інженерії. Прикладом може служити впроваджений афінний хроматографічний сорбент із білком А (*Protein A Sepharose Fast Flow*), де приєднаний до матриці ліганд споріднений до карбоксильних кінців завдяки приєднанню додаткового цистеїну в цьому місці. Це забезпечує одержання ефективнішого хроматографічного сорбенту з 80 % збільшенням ємності для Ig G людини.

Незважаючи на існування безлічі афінних сорбентів, придатних для великомасштабного очищення, сучасний рівень промисловості потребує все нових і нових лігандів. Ліганди можуть бути з'єднані з належним хроматографічним сорбентом під час виробництва або на місці експлуатації, що полегшується наявністю попередньо активованого хроматографічного сорбенту. Хороша базова матриця для афінного сорбенту повинна:

- забезпечити належні точки приєднання;
- мати великий розмір пор (забезпечення місця для великих лігандів і швидкий доступ до них);
- мати велику площу поверхні (висока пропускна здатність);
- бути хімічно інертною.

Для досягнення кількісної адсорбції розчинених речовин константи зв'язування мають бути достатньо високими (тобто константа асоціації повинна бути більше 10^5 M^{-1}). За нижчих констант асоціації розчинена речовина лише вповільнюється на колонці. Об'єм зразка має знижуватися, при цьому для забезпечення належного розподілу може знадобитися довга колонка (системи, у яких константа асоціації нижча 10^4 M^{-1} , називаються *слабкими афінними системами*). Важливо зазначити, що константа асоціації впливає на ступінь використання продуктивності сорбенту. Наприклад, низька

константа асоціації та низька концентрація розчиненої речовини є небажаними для препаративної афінної хроматографії. У цьому випадку рекомендується перед стадією афінної хроматографії провести, наприклад, стадію іонообмінної хроматографії з метою збільшення концентрації розчиненої речовини для подальшої передачі на стадію слабкої афінної хроматографії.

За високих констант асоціації (тобто низьких констант дисоціації) розчинена речовина адсорбується в більших кількостях, домішки вимиваються, а чиста розчинена речовина елююється шляхом ступінчастої зміни складу рухомої фази.

Є підстави вважати, що адсорбція розчинених речовин з великими молекулами повільніша в афінній хроматографії, ніж у інших адсорбційних процесах, оскільки ця взаємодія потребує правильної орієнтації розчиненої речовини. Тому для адсорбції зазвичай рекомендують низькі швидкості потоку. Однак кінетику афінної хроматографії можна порівняти з кінетикою іонообмінної хроматографії, і в більшості публікацій з афінної хроматографії швидкість потоку спеціально не розглядається щодо мети процесу. Однак стосовно адсорбційних режимів продуктивність зростає зі збільшенням часу перебування матеріалу в колонії.

Десорбція при афінній хроматографії досягається шляхом збільшення константи дисоціації (наприклад, для десорбції розчинених речовин необхідно, щоб константа дисоціації комплексу "ліганд – розчинена речовина" була вищою за 10^{-10} М). Цього можна досягти зниженням рН, збільшенням іонної сили або шляхом конкурентної елюції, коли агент буде конкурувати з розчищеною речовиною або лігандом за місця/ділянки зв'язування. Забруднюючі речовини (луги, елюючі речовини), можливо, мають бути відділені на наступній стадії (стадія гелі-фільтрації). Наприклад, десорбція при афінній хроматографії з іммобілізованим металом включає зниження рН, збільшення іонної сили або видалення іона металу шляхом додавання етилендіамінтетраоцтової кислоти (або іншої сильної комплексоутворюючої речовини).

Теоретична зв'язувальна здатність для білка з молекулярною масою 60000 Да становить близько 80 мг/мл на 4 %-му

агарозному афінному сорбенті. Комерційні сорбенти сильно відрізняються за сорбційною здатністю, однак адсорбційна здатність сучасних середовищ наближається до теоретичної межі.

Гідрофобна хроматографія. Молекули з гідрофобними ділянками на поверхні можуть бути розділені за допомогою їх взаємодії з неполярним лігандом. Така взаємодія опосередковується полярним розчинником і підсилюється високою іонною силою рухомої фази. Елюція зазвичай проводиться шляхом зниження іонної сили рухомої фази для збільшення розчинності молекули в рухомій фазі (хоча існують також інші методи зниження полярності розчинника). Основним є принцип, подібний до хроматографії на зворотній фазі, однак умови значно м'якші, зазвичай забезпечують збереження четвертинної структури й, відповідно, активності білків, хоча сильні гідрофобні взаємодії можуть викликати зміни конформації білка.

Хроматографічні сорбенти для гідрофобної взаємодії складаються переважно із сорбентів для гель-фільтрації, до яких "пришиті" гідрофобні групи. Зазвичай групи, що використовуються, розташовуються за зростанням сили гідрофобної взаємодії таким чином: бутіл < октил < феніл. Взаємодія зростає зі збільшенням щільності розташування лігандів. Ступінь заміщення на 1–2 порядки нижчий, ніж у випадку середовищ для хроматографії на зворотній фазі, і зазвичай перебуває в інтервалі 10–50 мкмоль на 1 мл хроматографічного сорбенту, що звичайно забезпечує блокувально-зв'язувальну ємність до 60 мг/мл.

На ступінь взаємодії при гідрофобній хроматографії вирішальний вплив здійснює тип ліганду, "пришитого" до сорбенту. Взаємодія зазвичай збільшується відповідно до збільшення довжини вуглецевого ланцюга та вмісту ароматичних циклів. Взаємодія може бути посилена солями, відомими як космотропні (сприяють упорядкованості водної структури), хоча для різних солей складно одержати значні зміни вибіркової. Подібний ефект може бути досягнутий шляхом зміни об'єму градієнта. Сумісний вплив певного типу солі й певного типу ліганду може забезпечити необхідне

розділення (при збереженні одного параметра постійним і зміні іншого). Однак, щоб уникнути занадто високих іонних сил (які можуть спричинити втрату зразка), краще використовувати найбільш гідрофобний ліганд, сумісний з білком, тобто такий, що не викликає денатурацію.

Найкраща ситуація в очищенні досягається при підборі умов кондиціонування РЦП, коли домішки не адсорбуються на колонці, що можливо лише у випадку, коли вони адсорбуються слабкіше, ніж РЦП. Іонна сила адсорбуючого буфера може бути підібрана таким чином, щоб сприяти адсорбції продукту та більш гідрофобних розчинених речовин. Однак важливо переконатися, що продукт зв'язується, а не лише затримується на хроматографічному сорбенті, оскільки друга умова не забезпечує надійного способу очищення. Продуктивність при хроматографії гідрофобної взаємодії корелює, як і для інших методів хроматографії, з кількістю матеріалу, що пропускається через колонку на одиницю об'єму сорбенту. Пропускна здатність дорівнює виходу продукту за одиницю часу. Пропускна здатність при хроматографії гідрофобної взаємодії дуже висока – понад 30 мг/мл для білка, і вихід може бути значним. Однак завантаження зразка при хроматографії гідрофобної взаємодії значно залежить від його розчинності в буфері з високою іонною силою, який використовується для адсорбції, а також часу утримання зразка. Вплив іонної сили адсорбуючого буфера на використання адсорбційної ємності може бути досить значним. З іншого боку, адсорбційна ємність для продукту може бути різко знижена за рахунок компонентів з розчину РЦП, що спільно адсорбуються, а видобуток цільового продукту може бути неефективним через можливі несприятливі умови, що викликають осадження на колонці розчинених речовин.

Хроматографія на зворотній фазі. При проведенні хроматографії на зворотній фазі гідрофобні речовини, розчинені в полярному розчиннику, розділяються завдяки їх вибірковій взаємодії з хроматографічним середовищем. Рідка фаза складається з водного буфера, що містить органічний модифікатор, розчинний у воді, і цей модифікатор є рідкою

межею розділення на неполярних лігандах. Перші розділення за допомогою хроматографії на зворотній фазі були проведені наприкінці 40-х рр. XX ст., коли шість полярних розчинених речовин були розділені на хімічно модифікованих м'яких полімерних гелях. Хроматографія на зворотній фазі була використана для очищення поліпептидів наприкінці 70-х рр. XX ст. і з того часу набула поширення завдяки високій роздільній здатності. Що стосується біомолекул, то хроматографія на зворотній фазі використовується переважно для розділення пептидів, включаючи їх широкомасштабне препаративне виробництво. Висока поверхнева активність стаціонарної фази у хроматографії на зворотній фазі викликає сильні взаємодії з розчиненою речовиною. Це може зумовити порушення вищих рівнів структури білка, що призведе до денатурації та втрати активності. Тому застосування хроматографії на зворотній фазі для препаративного очищення білка зазвичай обмежується стабільними розчиненими речовинами або речовинами, які можуть бути ренатуровані. Використання до 80 % органічних модифікаторів у буфері також накладає певні обмеження на застосування методу для широкомасштабних очищень (наприклад, необхідним є вибухобезпечне обладнання, а витрати на розчинник можуть значно збільшити витрати на виробництво).

Сорбенти для хроматографії на зворотній фазі складаються із базової матриці, до якої "пришивають" органічні ліганди, зазвичай n-алкілові ланцюги. У деяких випадках базова матриця є досить неполярною для того, щоб забезпечити ліпофільне середовище, необхідне для взаємодій, при цьому ніякої "прошивки" не потрібно. Базові матриці включають оксид кремнію, оксид цирконію, полістирол/дивінілбензол та інші типи органічних полімерів. Зазвичай тип базової матриці значною мірою впливає на розділення, переважно завдяки поверхневим взаємодіям. Незважаючи на те, що оксид кремнію використовується як базова матриця для аналітичної хроматографії на зворотній фазі, його обмежена стійкість за лужних рН лімітує застосування для очищення у виробничих масштабах. Значний вплив оксидокремнієвої базової матриці на

процес розділення може створити проблеми з відтворюваністю результатів від партії до партії та масштабуванням, у зв'язку з чим регуляторними органами розвинених країн (наприклад FDA Сполучених Штатів Америки) були надані рекомендації щодо обмеженого використання таких хроматографічних сорбентів. Відповідно нині значний інтерес для широкомасштабного очищення становлять сорбенти на основі полімерів.

Ліпофільна поверхня або покриття притягатимуть молекули органічного модифікатора, які будуть утворювати рідку адсорбційну фазу. Як покриття для оксиду кремнію використовують різноманітні ліганди, зазвичай бутилові, октилові та октадецилові групи (позначають C_4 , C_8 та C_{18}). Для більших молекул довжина ланцюжка ліганду сама по собі не дуже важлива, утримання переважно визначається щільністю ліганду та властивостями матриці. Коротчі ліганди зазвичай використовуються для розділення білків (збільшення видобутку), а довші – пептидів.

Оскільки утримання в хроматографії на зворотній фазі зумовлене поверхневими взаємодіями між розчиненою речовиною та хроматографічним середовищем, то першим кроком для досягнення вибіркової має стати відбір сорбентів. Вибір ліганду здійснюють, виходячи з таких передумов: взаємодія не має бути настільки сильною, щоб викликати денатурацію розчиненого продукту (це означає, що використовують менші довжини ліганду) і усунути екстремальні умови елювання. Слід також зазначити, що базова матриця може впливати на розділення завдяки щільному контакту з поверхнею. Використовуючи хроматографію на зворотній фазі, можна регулювати розділення РЦП, змінюючи склад рухомої фази, як у випадку з іонообмінною хроматографією. Зміна рН впливатиме на ступінь іонізації й може бути використана для регулювання вибіркової для малих розчинених молекул. Однак цей вплив є непередбачуваним для більших розчинених речовин, наприклад білків, а загальні рекомендації полягають у тому, щоб працювати за низьких рН для збереження симетричної форми піка. Заряд розчиненої речовини може бути прихований шляхом додавання до рухомої фази реагентів, що

зв'язуються з іонами (наприклад трифтороцтової кислоти). Ацетонітрil найчастіше використовується як органічний модифікатор, хоча інші модифікатори, такі як пропанол, метанол і етанол, також припустимі. У хроматографії на зворотній фазі елюція проводиться переважно за допомогою градієнта, але загальне правило для іонообмінної хроматографії, згідно з яким максимальний ефект досягається в діапазоні від 5 до 20 об'ємів колонки градієнта, застосовне і тут. Слід зазначити, що ефект відрізняється для великих розчинених речовин, наприклад білків, порівняно з меншими за розмірами розчиненими речовинами, такими як пептиди.

Поряд із хроматографією перспективними методами розділення речовин при біотехнологічних процесах є також *електрофорез* і його модифікації. У цих методах суміш, що розділяється, поміщають у потужне електричне поле, яке забезпечує рух її іонізованих компонентів. Відмінності електрофоретичної рухливості дозволяють просторово розділити компоненти. Сучасні варіанти електрофорезу використовують (як і хроматографія) пластинки або колонки з наповнювачами, що формують гель (агароза, поліакриламід, сефароза, оксиапатит та ін.).

Модифікацією методу електрофорезу є ізоелектричне фокусування, або електрофокусування. У цьому методі розчин, що насичує гель, містить сполуки з кислотно-основними групами. Під впливом електричного поля кислотно-основні групи буферної системи змінюють ступінь іонізації, створюючи таким чином градієнт рН у напрямку електричного поля. Електрично заряджені компоненти суміші, нанесеної на гель, мігрують у напрямку до електрода протилежного знака. Оскільки ці компоненти рухаються за градієнтом рН, то вони поступово втрачають заряди й у зоні, де рН відповідає їх ізоелектричній точці (точка електронейтральності), їх рух припиняється. Кожний компонент концентрується (фокусується) у певній зоні гелю та значення рН.

Мембранні методи розділення. До мембранних методів розділення належать:

- 1) діаліз і електродіаліз;

- 2) зворотний осмос;
- 3) мікрофільтрація;
- 4) ультрафільтрація.

В основі цих методів лежить явище осмосу – дифузії розчинених речовин через напівпроникну перегородку-мембрану зі значною кількістю (до $10^{10} - 10^{11}$ на 1 м^2) дрібних отворів-пор, діаметр яких не перевищує 0,5 мкм. Під мембраною зазвичай розуміють високпористу або безпористу пласку або трубчасту перегородку, оформлену з полімерних або неорганічних матеріалів і здатну ефективно розділяти частки різних видів (іони, молекули, макромолекули та колоїдні частки), що містяться в суміші або розчині. Використання мембран дозволяє створювати економічно високоефективні та маловідходні технології.

Серед мембранних методів особливо інтенсивно розвиваються баромембранні. Якщо зворотний осмос вивчений досить повно, то значно меншою мірою це стосується мікрофільтрації й тим більше ультрафільтрації, незважаючи на їх очевидну перспективність. Межі баромембранних методів розділення чітко не визначені, що, вочевидь, принципово неможливо, оскільки мікро- й ультрафільтрація та зворотний осмос у широких межах перекриваються як щодо їх фізико-хімічного опису, так і завдань, які вони дозволяють розв'язувати. Отже, наведена класифікація барометричних методів розділення досить умовна. Проте кожен із зазначених методів має характерні особливості, на підставі яких запропоновано кілька класифікацій.

Мікрофільтрація переважно є гідродинамічним процесом, близьким до звичайної фільтрації. Специфічна особливість мікрофільтрації – використання мембран з діаметром пор від 0,1 до 10 мкм для відділення дрібних часток твердої фази, у тому числі й мікроорганізмів (стерилізуюча фільтрація). Тому, на відміну від звичайної фільтрації, при мікрофільтрації явища дифузії (особливо за невеликих розмірів пор – від 0,1 до 0,5 мкм) також відіграють певну роль.

В основі *ультрафільтрації* лежить використання мембран з діаметром пор від 0,001 до 0,1 мкм. Ультрафільтрація

застосовується для розділення клітин і молекул. Мембранні методи розділення біологічних суспензій мають низку переваг:

1) концентрування й очищення здійснюються без зміни агрегатного стану і фазових перетворень;

2) продукт, що переробляється, не піддається тепловим і хімічним впливам;

3) механічний і аеродинамічний впливи на біологічний матеріал незначні;

4) легко забезпечуються герметичність і асептичні умови;

5) апаратурне оформлення компактне за конструкцією, відсутні рухомі деталі;

6) процес не характеризується високою енергоємністю, у більшості випадків енергія витрачається лише на перекачування розчинів.

Механізм перенесення атомів, молекул або іонів різних речовин через напівпроникні мембрани можна пояснити відповідно до однієї з таких теорій. *Теорія просівання* припускає, що в напівпроникній мембрані існують пори, розміри яких достатні для того, щоб пропускати розчинник, але занадто малі для того, щоб пропускати молекули або іони розчинених речовин. *Теорія молекулярної дифузії* заснована на різній розчинності й відмінностях коефіцієнтів дифузії компонентів, що розділяються. *Теорія капілярно-фільтраційної проникності* ґрунтується на відмінностях фізико-хімічних властивостей граничного шару рідини на поверхні мембрани й розчину в об'ємі. Серед запропонованих теорій найбільше поширення одержала капілярно-фільтраційна.

Основним робочим елементом мембранних апаратів є напівпроникні мембрани. Мембрани повинні мати високу роздільну здатність (селективність), високу питому продуктивність (проникність), сталість характеристик у процесі експлуатації, хімічну стійкість у розділяючому середовищі, механічну міцність, невисоку вартість. Селективність і проникність – найважливіші технологічні характеристики мембран і апарата загалом.

Селективність мембрани залежить від розміру та форми молекул розчиненої речовини. Варто мати на увазі, що майже в

усіх випадках існують молекули, які лише частково затримуються мембраною. Мембрани виготовляють із різних матеріалів: полімерних плівок, скла, кераміки, металевої фольги тощо. Найбільше застосовуються мембрани з полімерних плівок.

Напівпроникні мембрани бувають пористі й непористі. Крізь непористі мембрани процес здійснюється за рахунок молекулярної дифузії. Такі мембрани називаються *дифузійними* й використовуються для розділення компонентів із близькими властивостями. Пористі мембрани виготовляють переважно з полімерних матеріалів, вони поділяються на *анізотропні* та *ізотропні*. Пористі мембрани одержують зазвичай шляхом видалення розчинників або вимиванням попередньо введених домішок з розчинів полімерів при їх формуванні. Отримані таким способом мембрани мають тонкий (0,25–0,5 мкм) поверхневий шар на мікропористій підкладці товщиною 100–250 мкм. Процес мембранного розділення здійснюється в поверхневому активному шарі, а підкладка забезпечує механічну міцність мембрани.

Широко розповсюджені також ядерні мембрани, або нуклеопори. Вони утворюються при опроміненні тонких полімерних плівок зарядженими альфа-частинками з подальшим травленням пор хімічними реагентами.

До основних переваг ядерних мембран належать:

- правильна кругла форма пор;
- можливість одержати мембрани із заздалегідь заданими розмірами та кількістю пор;
- однаковий розмір пор;
- хімічна стійкість.

Ядерні мембрани виготовляють на основі полікарбонатних плівок з діаметром пор від 0,1 до 8 мкм. Поряд з полімерними відомі мембрани з жорсткою структурою: металеві, з пористого скла, керамічні. Металеві мембрани виготовляють вилугуванням або сублімацією одного з компонентів сплаву фольги. При цьому одержують високопористі мембрани з порами однакового розміру – у межах 5–0,1 мкм. Інший спосіб одержання металевих мембран – спікання металевих порошку за високих температур методами порошкової металургії.

Недоліки мембранних методів розділення:

1) деякі матеріали, з яких виготовляють мембрани, швидко зношуються;

2) виникають певні труднощі при обробці розчинів, що містять тверду фазу.

Проте слід зазначити перспективність застосування мембранних методів розділення в технології мікробіологічного синтезу.

До основних мембранних методів розділення рідких систем належать зворотний осмос, ультра- та мікрофільтрація. Ці методи характеризуються такими спільними рисами, як використання напівпроникних мембран, застосування як рушійної сили процесу надлишкового тиску, способами боротьби з концентраційною поляризацією. Поділ зазначених методів досить умовний і базується зазвичай на розмірах об'єктів, що фільтруються, і розмірах пор відповідних напівпроникних мембран.

Чіткіше варто розмежовувати методи ультра- та мікрофільтрації за фазовими станами систем, що розділяються (розчини та суспензії), а методи ультрафільтрації та зворотного осмосу – за механізмами проникності (в'язка течія й активована дифузія). Можна приблизно визначити, що зворотноосмотичні мембрани здатні затримувати частки розміром більше 10^{-4} мкм, тобто гідратовані неорганічні іони, а ультрафільтрація ефективніша для часток розміром більше 10^{-3} мкм, тобто ультрафільтраційні мембрани можуть затримувати органічні молекули та іони. Відповідно мікрофільтрація дозволяє ефективно затримувати частки від 5×10^{-2} до 10 мкм, які не осаджуються з розчинів у полі гравітаційних сил.

Чітко визначити межу застосування різних мембранних методів неможливо як через спільність фізичних явищ, що лежать у їхній основі, так і через широкий спектр властивостей і природи речовин, що розділяються баромембранними методами.

Розділення розчинів і суспензій методом мікрофільтрації засноване на відмінностях і ефективних гідродинамічних розмірах молекул і часток, що розділяються. Процес розділення описується в рамках різних теорій і механізмів напівпроникності, що враховують вплив фізико-хімічних,

гідродинамічних і міжмолекулярних факторів на проходження часток крізь мембрани.

Зазвичай аналіз і розрахунок процесів ультра- та мікрофільтрації виконується з єдиних позицій. Такий підхід правомірний, якщо врахувати, що їх перебіг зазвичай супроводжується утворенням на мембрані шару осаду, який заважає ефективному перенесенню. Утворення осаду і його властивості можуть бути описані єдиними залежностями. Поверхневі явища на межі мембрана – розчин, властивості розчину і розчиненої речовини (для мікрофільтрації – диспергованих часток) впливають на процес ультра- та мікрофільтрації.

Об'єкт, що застосовується в мікрофільтрації, – зазвичай колоїдні (дисперсні) системи, що мають дисперсне середовище (розчинник) і дисперсну фазу (частки, завислі в розчиннику). У розділенні цих фаз часто й полягає завдання мікрофільтрації рідин. Найважливішу роль у всіх процесах розділення відіграють адгезійні та електростатичні взаємодії часток з поверхнею мембрани.

Слід додати, що біологічні клітинні об'єкти є типовими ліофільними системами. Для них, на відміну від ліпофобних систем, характерна сильна міжмолекулярна взаємодія речовини дисперсної фази з дисперсним середовищем. Така взаємодія спричиняє утворення сольватних, гідратних (у випадку, коли дисперсійним середовищем є вода) оболонок з молекул дисперсійного середовища навколо часток дисперсної фази. Крім цього, клітини мікроорганізмів мають заряд (електрокінетичний потенціал – ЕКП), величина якого різна залежно від мікроорганізмів. Для одного виду мікроорганізмів величина заряду змінюється залежно від умов середовища та процесів, що відбуваються в самій клітині. Наявність у клітин заряду дозволяє розглядати біологічні суспензії як розчини електролітів.

Явище концентраційної поляризації. При розділенні розчинів і суспензій за допомогою напівпроникних мембран крізь мембрану переважно проходить розчинник. При цьому концентрація розчиненої речовини в пограничному шарі біля поверхні мембрани збільшується. Підвищення концентрації відбувається доти, поки під дією градієнта концентрацій, який виникає при

накопиченні розчиненої речовини між поверхнею мембрани й об'ємом розчину, не встановиться динамічна рівновага.

Явище утворення біля поверхні мембрани пограничного шару, у якому концентрація розчиненої речовини більша, ніж в основному об'ємі розчину, одержало назву *концентраційної поляризації*. Вплив концентраційної поляризації на фільтрацію завжди негативний, оскільки:

- знижується ефективний тиск унаслідок зростання осмотичного тиску розчину, зумовленого концентрацією саме в пограничному шарі, що призводить до зниження як швидкості процесу, так і селективності; скорочується термін служби мембран, який значною мірою залежить від концентрації розчиненої речовини;
- концентраційна поляризація пов'язана з утворенням пограничного шару, який відділяє поверхню мембрани від розчину в об'ємі й товщина якого в загальному випадку визначається гідродинамічними умовами в установці – інтенсивністю перемішування та швидкістю руху потоку; профіль концентрації шару залежить від режиму руху розчину. Розрізняють два режими концентраційної поляризації:
- передгелевий, коли концентрація біля поверхні мембрани (C_w) нижча за концентрацію гелеутворення (C_g);
- режим гелевої поляризації, коли $C_w = C_g$, і на мембрані утворюється шар гелю.

Утворення гелю на поверхні мембрани призводить до різкого падіння проникності та підвищення затримуючої здатності мікрофільтраційних мембран. Однак існує припущення, що зниження проникності при концентраційній поляризації мембрани досягається не повним блокуванням її пор шаром гелю, а їх модифікацією гелем таким чином, що ефективні розміри всіх пор зменшуються на деяку сталу величину R . Утворюється так звана динамічна гелева мембрана. При цьому в зменшених порах мембрани реалізується класичний капілярно-фільтраційний механізм розділення.

Вважають, що для виникнення концентраційної поляризації розміри фільтрованих часток мають забезпечувати критичне відношення розмірів частки та пори, що характеризує перехід з

передгелевого в гелевий режим концентраційної поляризації внаслідок збільшення коефіцієнта затримки. Для зменшення шкідливого впливу концентраційної поляризації на процес мікрофільтрації використовують різні способи: підвищують температуру (унаслідок чого знижується в'язкість і зростає концентрація гелеутворення), застосовують електричне поле, високі швидкості тангенціального потоку та пульсаційні режими фільтрації.

Вибір робочого тиску залежить від виду процесу, природи й концентрації розчину, що розділяється, типу мембрани, конструкції апарата, гідравлічного опору тощо. Для мікрофільтрації робочий тиск становить 0,03 – 0,1 МПа, він для кожного розчину визначається експериментальним шляхом. Збільшення робочого тиску збільшує швидкість фільтрації в певних межах через те, що викликає збільшення й ущільнення шару гелю на поверхні мембрани.

У результаті впливу високого тиску на мембрани можуть спостерігатися значні залишкові деформації: при знятті тиску структура мембрани не повертається у вихідний стан. Усадка структури мембрани знижує проникність і підвищує селективність.

Аналіз даних щодо впливу температури на селективність і проникність мембран при мікрофільтрації показує, що підвищення температури викликає збільшення і проникності, і селективності. Це пояснюється тим, що зменшується в'язкість пермеату, а також значно знижується вплив концентраційної поляризації мембран.

При збільшенні концентрації розчинених речовин погіршуються робочі характеристики мембран – питома продуктивність і селективність. При концентруванні підвищується осмотичний тиск розчину, а отже, знижується ефективна рушійна сила процесу розділення.

IV. Концентрування продукту. За виділенням продукту йде етап його концентрування за допомогою основних методів – зворотного осмосу, ультрафільтрації та випарювання. При застосуванні методу *зворотного осмосу* розчин, що концентрується, поміщається в "мішок" з напівпроникної

мембрани, зовні створюється осмотичний тиск, який перевищує осмотичний тиск розчину, у результаті чого розчинник починає витікати крізь мембрану проти градієнта концентрації розчиненої речовини, зумовлюючи подальше концентрування розчину.

Ультрафільтрація є способом розділення речовин (точніше їх концентрування) за допомогою мембранних фільтрів. Технологія ультрафільтрації приваблює простотою, відносною економічністю та помірним впливом на продукт, оскільки здійснюється при помірно низькому зовнішньому тиску. Метод не потребує зміни рН, іонної сили розчину або переведення продукту в іншу фазу, тому вважається перспективним при концентруванні малостабільних продуктів (деяких амінокислот, антибіотиків і ферментів).

Випарювання – це процес концентрування рідких розчинів шляхом часткового видалення розчинника упарюванням при нагріванні рідини. У деяких випадках випарений розчин піддають подальшій кристалізації. Концентровані розчини та тверді речовини, що одержують у результаті упарювання, легше й дешевше переробляти, зберігати і транспортувати. Зазвичай упарювання під час виробництва антибіотиків здійснюють за температури 60–70 °С під вакуумом, тому метод неприпустимий при переробці термолабільних біологічно активних речовин. Метод випарювання найдавніший і має істотний недолік: для видалення розчинника розчин, що концентрують, необхідно нагрівати. Проте він досить широко використовується, особливо в лабораторіях. У виробничих умовах частіше застосовують вакуумні випарники, які забезпечують м'якший режим концентрування. Нагрівальним агентом зазвичай є водяна пара, хоча використовується також обігрів рідким теплоносієм або електричними нагрівачами.

Апарати для випарювання бувають періодичної та безперервної дії з однократною й багаторазовою циркуляцією теплоносія. З метою досягнення рівномірного обігріву розробляються різного роду конструктивні вдосконалення систем випарювання. Концентрування методом випарювання може обмежуватися стадією одержання сиропоподібного розчину цільового продукту; така процедура називається

упарюванням, а продукт, що одержують, належить до категорії рідких. Подальше звільнення від вологи, що залишається в продуктах після зворотного осмосу, ультрафільтрації або випарювання, відбувається на стадії сушіння.

V. Зневоднення продукту (сушіння). У біотехнології застосовуються різні методи сушіння, вибір яких визначається фізико-хімічними та біологічними властивостями продукту, що зневоднюється, зокрема в'язкістю розчину або ступенем збереження життєздатності, якщо справу мають із живими об'єктами. Перспективним методом є зневоднення в газоподібних нагрівальних агентах (пара, повітря, вуглекислий газ, димові гази тощо), які з високою швидкістю подаються в сушильний апарат знизу, при цьому частки продукту, що зневоднюється, перебувають у газовому потоці. Схема такого сушильного апарата нагадує газофазний реактор. Перевага методу полягає в можливості регулювати інтенсивність масо-тепло-обміну за рахунок зміни тривалості перебування препарату в газовому потоці, а також можливість організації безперервного процесу. Недоліком методу є прилипання продукту до стінок сушильної камери.

Для зневоднення мікробних суспензій застосовуються барабанні сушарки, у яких барабани, що підігріваються, обертаються в ємностях із мікробною суспензією. Стикаючись зі стінками барабана, суспензія збезводнюється, і біомаса присихає до поверхні барабана. Засохлу біомасу видаляють спеціальними ножами. Особливо лабільні матеріали сушать у вакуумних сушильних шафах за знижених тиску і температури. Досить широко застосовуються в біотехнологічних виробництвах розпилювальні сушильні апарати, у яких розчини чи суспензії, що зневоднюються, обробляються шляхом пропускання крізь форсунки (або диски, які обертаються) в аерозоль. Останній подається в сушильну камеру з нагрітим газом (приблизно 110–150 °C). У таких сушарках виживання бактеріальних культур досягає лише 20–30 %, що зовсім не відповідає необхідній якості препаратів. Найпоширенішими є ліофільні сушарки, особливо для висушування лабільних білкових препаратів або препаратів медичного призначення. Препарати попередньо

заморожуються, і вода випаровується із замороженого стану при глибокому вакуумі.

Білкові продукти, які нестабільні в розчинах узагалі, або готові рідкі препарати, які не витримують тривалого зберігання, необхідно ліофілізувати. Дуже важливо правильно розробити процес *ліофілізації*, тому що під час нього існує багато ризиків необоротної денатурації білка і, як наслідок, втрати ефективності препарату.

Основною метою сушіння сублімацією є збереження біологічних матеріалів і фармацевтичних препаратів без ушкодження через заморожування води з подальшим видаленням льоду сублімацією. Під час сушіння сублімацією вода або інший розчинник видаляються у вигляді пари у вакуумній камері, залишаючи суху пористу масу приблизно тих самих об'єму та форми, що й заморожений розчин. Кінцевий продукт перебуває у стабільній формі, його можна швидко повторно розчинити у воді завдяки структурній стійкості поверхні, з якої здійснюється сублімація замороженого продукту. Ця стійкість запобігає руйнуванню твердої матриці, що залишається після висихання. У результаті утворюється пориста, непресована структура, що полегшує швидку і практично повну повторну гідратацію після додавання води. Однак сушіння сублімацією є дорогим процесом дегідратації для фармацевтичних препаратів через повільну швидкість висушування та застосування вакууму.

Для того щоб досягти задовільної швидкості сушіння ліофілізацією, потрібно створити дуже низький тиск або глибокий вакуум. Наприклад, якщо взяти дистильовану воду, то її можна сублімувати за температури, яка дорівнює або близька до 0 °C, і абсолютного тиску 4,58 мм ртутного стовпа. Однак, оскільки вода зазвичай має кілька станів у розчинах білка, то матеріал треба охолодити нижче 0 °C для утримання її у твердій фазі. Більшість фармацевтичних сушень сублімацією виконують за температури -20 °C або нижче, абсолютного тиску приблизно 0,3 мм ртутного стовпа або навіть менше. Метод ліофілізації включає три стадії:

- 1) заморожування;
- 2) первинного висушування;

3) вторинного висушування.

На стадії заморожування продукт або розчин охолоджують до температури, за якої весь матеріал перебуває в замороженому стані. Її особливістю є поява замороженої води у вигляді кристаликів льоду (65–90 % від усієї води) і незамороженої води (10–35 %), яка перебуває в адсорбованому (зв'язаному) стані. Для процесу висушування істотне значення має форма кристалів утворюваного льоду, яка залежить від складу розчину та швидкості заморожування. Дрібні, переривчасті крижані кристали зменшують швидкість масопередачі водяної пари у висушеному шарі, знижуючи швидкість сушіння; натомість утворення великих деревоподібних кристалів підвищує її у висушеному шарі. Отже, метод і швидкість заморожування, так само як і склад розчину та природа продукту, є критичними для процесу ліофілізації, оскільки визначають швидкість сушіння і якість продукту.

На первинній стадії висушування заморожений розчинник видаляють сублімацією, для чого в системі необхідно створити тиск менший, ніж рівноважний тиск водяної пари над замороженим розчинником. З цієї причини на першій стадії висушування температуру замороженого шару найчастіше знижують до -20°C або нижче за абсолютного тиску приблизно 0,3 мм ртутного стовпа чи нижче. Оскільки розчинник (лід) випаровується, то сублімаційна поверхня (площина сублімації), що починається із зовнішньої поверхні, руйнується, залишаючи по собі висушений пористий матеріал. Тепло для латентної теплоти сублімації (2840 кДж/кг льоду) може підводитися крізь шар висушеного матеріалу і крізь заморожений шар.

Випаровування молекул води спричиняє зниження температури замороженого продукту, отже, якщо відсутнє джерело тепла, то тиск водяної пари над матеріалом досягає тієї самої величини, що й парціальний тиск водяної пари в сушильній камері; система досягає рівноваги й сублімація води з продукту стає неможливою. Щоб досягти безперервної сублімації води з продукту, прихована теплота сублімації має бути підвищена джерелом тепла. Подачу тепла зазвичай здійснюють перенесенням, конвекцією та/чи радіацією. Процес

десорбції у висушеному шарі може потребувати додаткової кількості тепла на поверхні розділу сублімації, що може впливати на швидкість фронту сублімації. Кількість тепла, що може подаватися до продукту, не може зростати вільно, оскільки є певні обмежувальні умови, яких має бути дотримано протягом первинної стадії висушування, а саме:

- не спричинити втрати біоактивності;
- не допустити зміни кольору;
- не активувати можливі руйнівні хімічні та біохімічні реакції;
- не викликати структурної деградації у висушеному шарі;
- запобігти плавленню.

Максимально припустима температура, за якої заморожений шар не зазнає плавлення, розтріскування кристалів під час нагрівання, усадки, руйнування та втрати властивостей продукту або його стабільності, є індивідуальною для кожного продукту, тому її визначають експериментально. Водяну пару, виділену сублімацією замороженої води в замороженому шарі та десорбцією адсорбованої (незамороженої) води у висушеному шарі, треба безупинно видаляти із сушильної камери, щоб забезпечити нерівноважні умови. Цього зазвичай досягають установленням конденсатора льоду між сушильною камерою та вакуумним насосом, де водяна пара заморожується на охолодженій поверхні. Час, коли лід цілком випаровується і заморожений шар зникає (тобто відсутня поверхня розділу сублімації), є часом закінчення первинної стадії висушування.

На вторинній стадії висушування видаляють розчинник (воду), який не було заморожено (адсорбована чи зв'язана вода). Зв'язану воду видаляють нагріванням продукту у вакуумі, тепло доставляють до продукту методами провідності, конвекції та/чи радіації. Зазвичай використовують такі температурні умови:

- нижче 0 °C для вакцин;
- між 10 та 35 °C для чутливих до нагрівання продуктів;
- 50 °C або більше для менш чутливих до тепла продуктів.

Залишкова волога у висушеному матеріалі наприкінці вторинної стадії висушування і температура, за якої висушений матеріал зберігають, є критичними факторами для стабільності

продукту на весь період його зберігання. Деякі вакцини залишаються стабільними протягом багатьох років, якщо їх зберігали при -20°C , але значно втрачають титр після одного року зберігання при 37°C . Крім того, інші вакцини (наприклад проти кору) можуть бути ушкоджені пересушуванням (для кращого збереження титру їм необхідна вологість близько 2 %), тоді як інші матеріали (наприклад антибіотики) мають бути висушені до залишкової вологості нижче 0,1 % для досягнення кращих результатів збереження. Завершенням формуляції є фасування продукту згідно зі способом реалізації.

VI. Модифікація продуктів. Різного роду модифікації необхідні в тих випадках, коли в результаті процесу ферментації виходить лише "попередник" цільового продукту. Наприклад, пеніцилін модифікується до напівсинтетичних препаратів, що надходять до споживача як комерційні. У деяких випадках при біотехнологічному процесі продуцент утворює якусь певну структуру, до якої вже хімічним шляхом додається необхідний компонент. Іноді біологічний об'єкт бере участь у певному етапі хімічних процесів, що забезпечують синтез цільового продукту. Модифікація є необхідним етапом при одержанні багатьох ферментів, гормонів і препаратів медичного призначення. Сполуки тваринного або рослинного, а також мікробного походження найчастіше необхідно змінювати таким чином, щоб надати їм необхідних якостей або підсилити вже наявні. Наприклад, у бичачого інсуліну модифікують амінокислотні залишки, після чого він стає ідентичним людському гормону.

VII. Стабілізація продукту. Для збереження необхідних властивостей одержуваних продуктів у процесі їх зберігання, реалізації й використання споживачами застосовують різного роду фізико-хімічні впливи з метою підвищення стабільності. Показано, що певний ступінь зневоднення істотно підвищує збереження ферментативних активностей, включаючи стійкість до нагрівання. Стабілізація ферментів також досягається додаванням до препаратів гліцерину або інших вуглеводів, які формують численні водневі зв'язки з амінокислотними залишками, перешкоджаючи тим самим їх денатурації при

нагріванні або спонтанній інактивації. У деяких випадках стабілізація продукту реалізується окремим біотехнологічним процесом, а не лише простими фізико-хімічними модифікаціями. Прикладом може бути стабілізація харчового продукту, який одержують із яєчних жовтків – меланжу, властивості якого при зберіганні істотно змінюються, що зумовлює його непридатність до використання. Однак псування меланжу можна уникнути, якщо видалити з його складу вуглеводи за допомогою вирощування на меланжі пропіоновокислих бактерій. Бактерії метаболізують вуглеводи, підвищують живильну цінність продукту за рахунок збагачення органічними кислотами й вітамінами групи В, а також значно подовжують терміни його зберігання.

VIII. Кристалізація – це виділення твердої фази у вигляді кристалів, переважно з розчинів і розплавів. Кристалізація антибіотиків та інших біологічно активних речовин заснована на різкому зменшенні їх розчинності в результаті зміни температури розчину (зазвичай зниження, але іноді, наприклад у випадку еритроміцину, підвищення) або переведення їх у погано розчинну хімічну форму. Останнє досягається зміною рН розчину чи додаванням відповідного реагенту, часто з одночасним зниженням температури. Кристалізація є не лише способом одержання антибіотиків у твердому вигляді, але й досить ефективним засобом очищення від супутніх домішок, що є істотною перевагою порівняно з деякими іншими методами поділу. Метод кристалізації застосовується в технології одержання антибіотиків (тетрацикліну, еритроміцину та ін.), вітамінів і полісахаридів.

IX. Формуляція. Формуляцією називають етап приведення складу продукту у відповідність до стандартів фармакопеї. У ній для кожного препарату визначено форму (порошок, рідина, пігулка тощо), колір, склад і властивості розчинника, концентрацію активної речовини, рівні припустимих домішок, спосіб застосування. Затверджують фармакопейну формулу після дослідження властивостей активної речовини й вивчення в доклінічних тестах її потенційного клінічного застосування.

Потенційне клінічне застосування білкового лікарського засобу визначено його біологічною функцією та стабільністю, а вони, у свою чергу, залежать від фізичних і хімічних властивостей білка. Такі фізико-хімічні характеристики білків, як амінокислотний склад, молекулярна маса, ізoeлектрична точка, глікозилювання та конформація визначають фармакокінетику, токсичність і клінічний ефект білкових препаратів. Головною причиною нестійкості біофармацевтичних продуктів є деградація, зумовлена агрегацією, дезамінуванням, окисненням, ізомеризацією, відщепленням пептидів, тіольним обміном дисульфідів тощо.

Для визначення оптимального формуляційного складу насамперед проводять дослідження стабільності цільового білка за різних значень рН і температури в короткотермінових тестах на початкових формуляційних буферах. Надалі фахівець із формуляції обирає найстабільніший склад, за якого можна досягти оптимального балансу між різними шляхами деградації. Завершенням роботи з формуляції є довготермінове дослідження стабільності продукту в обраному буферному розчині.

Вибір буферних систем при формуляції строго визначений фармакопеею та обмежений тими, для яких однозначно доведено відсутність впливу на організм людини. Швидкий скринінг формуляційного складу під час вивчення лабільності цільового білка за різних значень рН зазвичай проводять за короткий термін, але при підвищеній температурі 40 °С. Профіль рН стабільності для кожної формуляції розробляють як графік залежності швидкостей усіх реакцій деградації від рН. Обирають такий формуляційний склад, у якому всі реакції деградації мінімальні.

Температурну стабільність продукту в різних формуляційних складах визначають за допомогою графіка Арреніуса. Проте екстраполяція даних є коректною тільки в зоні лінійності реакції та постійної швидкості. Щоправда, через складність структури білкових молекул зазвичай у препараті одночасно проходить більше однієї реакції деградації, що може зумовити нелінійність графіка Арреніуса. Іноді шляхи деградації білків за високих температур зовсім

інші, ніж за низьких. Проте в більшості випадків прискорене вивчення термостабільності дає змогу цілком задовільно визначити оптимальний формуляційний склад препарату.

Після того, як стабільну формуляцію було обрано, зазвичай проводять дослідження стійкості до фізичних впливів, щоб визначити, чи необхідні домішки, які б стабілізували білок під час перемішування, розморожування, заморожування й освітлення. Перемішування – це процедура, якої неможливо уникнути під час фасування препарату, транспортування, перенесення чи ін'єкцій. Водночас збільшення поверхні розділу повітря – рідина внаслідок коливань може спричинити денатурацію білкової молекули. Наявність полярних і неполярних бічних ланцюгів зумовлює тенденцію білкових молекул концентруватися на поверхні розділу повітря – рідина, зміна мікрооточення може призвести до втрати молекулою нативної конформації з експозицією гідрофобних груп на поверхні розділу. Фахівці з формуляції обов'язково проводять дослідження з перемішування рідких білкових формуляційних складів для визначення, яка поверхнево-активна речовина може захистити білок від денатурації, коли зовнішнє вплив неминуче в процесі виробництва, транспортування або перенесення. Домішки поверхнево-активних речовин можуть або знизити поверхневе напруження, або розчинити білок, який концентрується на поверхні розділу фаз.

Звичайним для розчинів білків є довготермінове зберігання у вигляді замороженої субстанції, яку розморожують перед фасуванням, у формі рідкого білкового препарату або для сублімаційного сушіння. Існують також ризики аварійного заморожування й розморожування білків у рідких формуляціях під час транспортування та перенесення. Фахівці з формуляції мають проводити дослідження короткотермінової стабільності, коли проби, відібрані у визначених тимчасових точках, зберігають замороженими, а потім розморожують наприкінці експерименту для аналізу. Для гарантії стабільності під час розморожування-заморожування проводять принаймні три цикли дослідження.

Білкова денатурація при заморожуванні переважно викликана поділом фаз унаслідок формування кристалів льоду. Крім того, деякі буферні системи, наприклад натрій-фосфатна чи розчин бурштиновокислого натрію, змінюють рН у процесі заморожування. Спричинені заморожуванням зміни рН можуть викликати нестійкість рекомбінантних білків, як було зафіксовано для IFN- γ , формульованого в бурштиновокислому буфері. У таких випадках для запобігання денатурації продукту додають криозахисні речовини, зокрема сахари, багатоатомні спирти, амінокислоти, неорганічні й органічні солі.

Тривале передринкове дослідження стабільності білкових формуляцій призначене для відпрацювання специфічних умов зберігання та випуску лікарського засобу. Згідно з вимогами фармакопеї фармацевтичний виріб мусить зберігати не менше 90 % активного інгредієнта на момент закінчення його терміну зберігання. Під час розробки протоколу дослідження довготермінової стабільності лікарського засобу потрібно врахувати інтервали збереження й умови зберігання. Для зберігання в умовах охолодження (5 °C) і при кімнатній температурі (15–30 °C) визначено однаковий діапазон дослідження, зразки слід зберігати при 5, 15 та 25–30 °C і перевірити через 1, 2, 3, 6, 9, 12, 18 та 24 місяці, потім – щорічно. Ліофілізовані зразки слід аналізувати протягом триваліших інтервалів за вищих температур (наприклад 40 °C). Фармацевтичні ліки часто перевіряють за високих температур для оцінювання констант деградації при низьких температурах за допомогою графіків Арреніуса. У разі зберігання зразків за високої температури їх звичайно витримують при 37 або 40 °C й аналізують через 1, 3 та 6 місяців. Зразки можна також зберігати при 45 або 50 °C і випробовувати через 2 тижні, 1 та 2 місяці. Однак такі підвищені температури можуть бути наближеними до температури денатурації білка, що викличе його фізичну денатурацію, якої не відбулося б у реальних умовах. На додаток до визначення кількості активного інгредієнта в лікарському препараті має бути виконано також оцінювання продукту за рН, іонною силою, зовнішнім виглядом, кольором, прозорістю, наявністю твердих домішок,

стерильністю й пірогенністю (здатністю спричинювати підвищення температури тіла після ін'єкції).

Запитання для самоконтролю

1. У чому полягає і як називається перший етап при виділенні цільового продукту?
2. Укажіть методи, які належать до сепарації.
3. Опишіть фактори, що впливають на ефективність фільтрування.
4. З якою метою застосовують попередню, зокрема коагуляційну, обробку перед фільтрацією?
5. Укажіть недоліки фільтрування та як їх долають.
6. Порівняйте переваги центрифугування та фільтрування.
7. Наведіть методи, що застосовуються для дезінтеграції клітин у біотехнологічних виробництвах.
8. У яких випадках доцільно використовувати осадження при виділенні цільового продукту?
9. Які основні недоліки методів екстракції в біотехнологічних процесах?
10. За якою ознакою відбувається поділ при гел'фільтрації?
11. Що таке і для чого застосовується сефадекс?
12. Які фактори визначають продуктивність гел'фільтрації?
13. Як визначають оптимальний об'єм зразка, що можна нанести на колонку при гел'фільтрації?
14. Який заряд несе аніонообмінний хроматографічний сорбент, якою групою він зазвичай забезпечується?
15. Який тип хроматографії, на вашу думку, характеризується найбільшою специфічністю?
16. Наведіть приклади групоспецифічних лігандів.
17. Зазначте вимоги до оптимальних матриць для різних лігандів при афінній хроматографії.
18. Наведіть приклади лігандів для гідрофобної хроматографії.
19. Які методи розділення речовин належать до мембранних?
20. Охарактеризуйте вимоги, які висувають до мембран, що застосовуватимуться для розділення речовин.

21. Перерахуйте методи, що застосовуються для концентрування цільового продукту, порівняйте їх за ефективністю й економністю.

22. Поясніть принцип ліофільного сушіння речовин.

23. За яких умов відбувається сублімація води?

24. Які критерії впливають на ефективність ліофілізації?

25. Яку функцію виконує конденсатор льоду?

26. Охарактеризуйте температурні режими стадії вторинного сушіння при ліофілізації.

27. Наведіть приклади модифікації біотехнологічних продуктів.

28. Що таке формуляція?

29. Який критерій є визначальним при добірї формуляційного складу?

30. Який рівень початкової активності має зберігатися у фармпрепаратах на кінець терміну їх використання?

31. Яким критерієм має відповідати процес, щоб його можна було віднести до біотехнологічного?

3.3. Критерії оцінювання ефективності біотехнологічних процесів (на прикладі оцінювання ефективності ферментації)

У біотехнології при виборі методу отримування конкретного цільового продукту обов'язково має виконуватися техніко-економічне оцінювання альтернатив отримування подібних продуктів традиційними методами. Порівняно з відомими методами біотехнологічні процеси мають бути більш технологічними, економними й екологічними або взагалі виключати наявність альтернативи. Оцінювання альтернативності варіантів лише через собівартість продукту – одностороннє. Оцінкою ефективності біотехнології, крім якості одержуваного продукту, може служити також зіставлення експериментального і теоретичного виходу продукту, розрахованого за матеріально-енергетичним балансом процесу. Витрати й вартість сировини в широкомасштабних біотехнологічних процесах зазвичай є визначальними, тому

матеріально-енергетичне оцінювання в цьому випадку досить суттєве. І навпаки, при використанні процесів на основі високопродуктивних рекомбінантних штамів-продуцентів основні витрати зумовлюються не сировиною, а створенням і підтримкою продуцента, розробкою спеціальних умов його культивування. Отже, у такому випадку вартість сировини й енергоресурсів відіграють другорядну роль.

У будь-якому біотехнологічному процесі ключову роль відіграє біологічний об'єкт, його природа і фізіолого-технологічні характеристики. Для росту будь-якого біооб'єкта потрібний вихідний життєздатний посівний матеріал, джерела енергії та вуглецю, поживні речовини для синтезу біомаси, відсутність дії інгібіторів росту, відповідні фізико-хімічні умови ферментації (рН, температура, аерація та ін.).

У мікробіологічній промисловості продуктивність прийнято виражати в кілограмах продукту, одержуваного з 1 м^3 геометричного об'єму біореактора за добу, включаючи час на підготовку апаратури між процесами. У лабораторних дослідженнях продуктивність (r) звичайно виражають у $\text{г}/(\text{л} \cdot \text{год})$, відносячи до об'єму рідкої фази й ураховуючи тільки тривалість процесу біосинтезу. У безперервних процесах продуктивність утворення біомаси (Q_X) визначається за рівнянням

$$Q_X = DX,$$

де D – швидкість розведення біомаси протіканням середовища, год^{-1} ; визначається як відношення швидкості протікання f до об'єму апарата V : $D = f/V$; де f – швидкість протікання, $\text{м}^3/\text{год}$; W – кількість середовища, що надходить у апарат за одиницю часу t : $f = W/t$; X – концентрація біомаси.

При дотриманні умов стаціонарного стану питома швидкість росту (μ , год^{-1}) дорівнює швидкості розведення середовища $\mu = D$.

Продуктивність біотехнологічного процесу (Q_P) залежить від багатьох факторів, основними з яких є активність продуцента, ефективність біоконверсії, що характеризується виходом продукту із субстрату ($Y_{P/S}$) і концентрацією (X) активного каталізатора в біореакторі:

$$Q_P = q_S Y_{P/S} X,$$

де q_S – питома швидкість споживання субстрату, $\text{г}/\text{л} \cdot \text{год}$.

Розрахунки виходу продукту можна здійснювати різними способами (табл. 3.3). Найчастіше користуються величиною виходу продукту $Y_{P/S}$, яка відображає масу продукту, отриманого з певної кількості субстрату. Цю величину іноді називають *коефіцієнтом конверсії*.

Величина Y^T характеризує граничне значення виходу продукту, коли вся вільна енергія, що є в субстраті, переходить у продукт. Закони термодинаміки постулюють, що в хімічних реакціях вихід вільної енергії завжди менше одиниці. Отже, величина Y^T на практиці недосяжна, проте необхідна для технологічних розрахунків. Для наближеного кількісного визначення Y^T можна використовувати дані про елементний склад продукту та субстрату:

$$Y_{P/S}^T = \frac{\sigma_s \gamma_s}{\sigma_p \gamma_p},$$

де σ_s та σ_p – масова частка вуглецю в субстраті та біомасі; γ_s та γ_p – ступінь відновлення (кількість редуектонів) у субстраті та продукті.

Для органічної речовини $\text{C}_n\text{H}_p\text{O}_n\text{N}_q$ ступінь відновлення або кількість редуектонів у одному молі С розраховують за формулою

$$\gamma = 4 + p - 2n - 3q.$$

Величина Y^M має менше значення, ніж Y^T , і позначає граничний вихід при біохімічно здійснюваному перетворенні субстрату на продукт. Значення Y^M кількісно визначають за стехіометрією всіх біохімічних реакцій на шляху перетворення субстрату на продукт із врахуванням регенерації кофакторів і енергозабезпечення процесу.

Величину Y^E визначають на підставі практичних даних за формулами, наведеними в табл. 3.3.

Для зіставлення ефективності різних процесів можна користуватися енергетичним виходом процесу (η), який також називають *термодинамічною ефективністю процесу* (коефіцієнт, аналогічний коефіцієнту корисної дії, ККД):

$$\eta = Y^E / Y^T.$$

Таблиця 3.3. Характеристики кількості виходу продукту

Кількість продукту	Позначення	Причини, що обмежують досягну межу	Спосіб визначення
Теоретична	Y^T	Термодинамічні	За балансом енергії
Максимальна	Y^M	Генетичні та біохімічні	За реальним біохімічним балансом процесу
Експериментальна	Y^E	Фізіологічні й технологічні	За експериментальними даними: 1) $Y_{P/S}^Y = \frac{\Delta P}{\Delta S}$; 2) $Y_{P/S}^Y = \frac{q_P}{q_S}$ (у стаціонарних умовах)
Практична	$Y^П$	Технологічні, апаратні, організаційні	Аналіз результатів виробництва

Примітка. P – концентрація продукту, г/л; S – концентрація субстрату, г/л; q_P – питома швидкість синтезу продукту, г/(г · ч); q_S – питома швидкість використання субстрату, г/(г · ч).

Частину вільної енергії субстрату, яка втрачається в процесі біосинтезу, відносять до непродуктивних витрат, які описуються формулою

$$\beta = 1 - \eta.$$

Зручний експрес-метод визначення загальних непродуктивних витрат енергії в процесах мікробного синтезу заснований на розрахунках газобалансовим способом кількості кисню, що використовується на споживання невеликої кількості (імпульсу) енергетичного субстрату. Відношення експериментально визначеного біологічного окиснення (БО) до повного хімічного окиснення (пХО) субстрату пов'язане з коефіцієнтом β :

$$\beta = \text{БО}/\text{пХО}.$$

Основний спосіб збільшення виходу продуктів синтезу – підвищення вмісту біомаси у ферментері за одиницю часу, тобто підвищення швидкості росту клітин.

Ріст культури можна охарактеризувати часом подвоєння кількості клітин або біомаси. Однак ці величини можуть різнитися, тому що біомаса може збільшуватися й без поділу клітин. Якщо в умовах культивування час подвоєння біомаси (X) і кількості клітин (N) не різняться, то можна казати, що ріст культури відбувається із експоненційною залежністю:

$$dX/dt = \mu X \text{ або } dN/dt = \mu N.$$

Основні кількісні характеристики процесу розраховуються за рівняннями, наведеними в табл. 3.4.

Ріст культури мікроорганізмів залежить від температури, pH, редокс-потенціалу та інших факторів (табл. 3.5). Негативні фактори затримують ріст і утворення цільового продукту й навіть викликають відмирання частини клітин. У такому випадку говорять про специфічну швидкість (α) відмирання клітин, а дійсний ріст культури характеризують рівнянням

$$dX/dt = \mu X - \alpha X.$$

Первинне оцінювання ефективності біотехнологічних процесів за перерахованими параметрами виконується на стадії лабораторних розробок і випробувань, а далі уточнюється при масштабуванні на дослідних і дослідно-промислових стадіях.

Таблиця 3.4. Ключові показники процесу ферментації

Показник	Символ та одиниця виміру	Розрахункова формула	Примітка
Концентрація біомаси	X , г/л	$X = X_0 e^{\mu(t_1 - t_0)}$	Для логарифмічної фази росту
Концентрація субстрату	S , г/л		
Концентрація продукту	P , г/л		
Питома швидкість росту	μ , 1/ч	$\mu = \frac{X_1 - X_0}{X_1(t_1 - t_0)}$	
Коефіцієнт розведення	D , 1/ч	$D = \mu$	Для неперервного процесу
Продуктивність за біомасою	Q_x , г/(л · ч)	$Q_x = \frac{X_1 - X_0}{t_1 - t_0}$	Для періодичного процесу
		$Q_x = DX$	Для неперервного процесу
Продуктивність за продуктом	Q_p , г/(л · ч)	$Q_p = \frac{P_1 - P_0}{t_1 - t_0}$	Для періодичного процесу
		$Q_x = DP$	Для неперервного процесу
Питома швидкість споживання субстрату	q_s , г/(г · ч)	$q_s = \frac{S_0 - S_1}{X_1(t_1 - t_0)}$	

Закінчення табл. 3.4

Показник	Символ та одиниця виміру	Розрахункова формула	Примітка
Вихід продукту із субстрату	$Y_{p/s}$, г/г	$Y_{p/s} = \frac{q_p}{q_s} = \frac{P_1 - P_0}{S_1 - S_0}$	
Вихід біомаси із субстрату	$Y_{x/s}$, г/г	$Y_{x/s} = \frac{\mu}{q_s} = \frac{X_1 - X_0}{S_0 - S_1}$	
Питома швидкість утворення продукту	q_p , г/(г · ч)	$q_p = \frac{P_1 - P_0}{X_1(t_1 - t_0)}$	

**Таблиця 3.5. Основні фактори середовища,
що визначають ріст і біосинтетичну активність продуцентів**

Фактор	Роль при культивуванні	Методи керування фактором
Склад і концентрація живильних речовин	Забезпечує метаболізм	Створення оптимальної композиції; підживлення під час ферментації; безперервність процесу; багатостадійність із врахуванням потреб продуцента по фазах розвитку тощо
Концентрація продуктів та інгібіторів	Регулює біохімічні реакції	Осадження продукту в міру нагромадження; ферментація з діалізом; ферментація під розрідженням з випаром летючого продукту тощо
pH	Оптимізує швидкості біохімічних реакцій	Регулювання шляхом додавання кислоти або лугу
Температура	Оптимізує швидкості біохімічних реакцій	Охолодження або підігрів культуральної рідини за допомогою теплообмінників або температури субстратів, що подаються у ферментер
Осмотичний тиск або активність води	Визначає границі життєдіяльності (становить 0,6–0,998)	Складання середовищ із оптимальною концентрацією живильних речовин або вологістю твердого середовища; підтримка на постійному рівні під час ферментації шляхом розведення водою або додавання окремих компонентів
Вміст розчиненого кисню	Для аеробів забезпечує аеробний метаболізм; є акцептором H^+ ; інгібує розвиток анаеробів	Для аеробних процесів регулюють інтенсивністю аерації або додаванням до газової суміші кисню. Анаеробні процеси реалізують у безкисневому середовищі

Закінчення табл. 3.5

Фактор	Роль при культивуванні	Методи керування фактором
Вміст діоксиду вуглецю	Джерело вуглецю для автотрофів; гетеротрофи можуть сповільнювати метаболізм у присутності CO ₂	Продування у фотосинтезуючих процесах ферментації газовим середовищем, збагаченим на CO ₂ ; виділенню CO ₂ з рідкої фази сприяє перемішування
Перемішування середовища	Рівномірний розподіл живильних речовин і біомаси по всьому об'єму середовища	Організують макро- і мікроперемішування за допомогою механічних мішалок, барботажних, циркуляційних та інших систем
В'язкість середовища	Визначає дифузію живильних речовин і перемішування клітин продуцента	Регулювання компонентами харчування, характером і концентрацією біомаси, наявністю деяких полімерних продуктів. В'язкість впливає на перемішування й аерацію; потрібні спеціальні технічні засоби

Запитання для самоконтролю

1. Який критерій є визначальним при оцінюванні ефективності великомасштабного біотехнологічного виробництва?
2. Чим відрізняється спосіб вираження продуктивності при мікробному синтезі у виробництві та в лабораторних умовах?
3. Що таке величина виходу продукту (коефіцієнт конверсії)?
4. Які характеристики кількості виходу продукту вам відомі?
5. Поясніть, що таке непродуктивні витрати.
6. У яких одиницях визначається питома швидкість утворення продукту і використання субстрату?
7. Наведіть фактори, від яких залежить ріст культури.

3.4. Контроль і керування біотехнологічними процесами, моделювання та оптимізація

Ефективність біотехнологічних процесів тісно пов'язана з удосконаленням способів контролю та керування. У період передісторії біотехнології були здійснені окремі спроби регулювати розвиток продуцента за допомогою змін параметрів зовнішнього середовища. До середини ХХ ст. регулювання здебільшого зводилося до емпіричних заходів, тому що без розуміння суті того, що відбувається, неможливо ефективно контролювати та керувати процесом. Переважно об'єктом керування того періоду була екстенсивна періодична культура мікроорганізмів з усіма її недоліками: динамікою стану продуцента і середовища, відсутністю засобів контролю. В останні 25 років із впровадженням керованих культур біотехнологи переходять від простого задання підтримки певних параметрів середовища до керування процесом загалом. Для реалізації керованого культивування потрібна побудова алгоритмів керування, заснованих на моделях біотехнологічного процесу. У сучасних біотехнологічних процесах необхідно

реєструвати й аналізувати безліч факторів, що швидко змінюються, зокрема концентрацію субстрату, біомаси і продукту в культурі, pH, температуру, парціальний тиск кисню тощо (табл. 3.6), для чого необхідна електронна техніка. Початкові спроби застосування цифрових систем у біотехнології належать до кінця 60-х рр. XX ст. На перших етапах комп'ютер використовували як "порадник" для оператора, який керував виконавчими механізмами для підтримки оптимальних параметрів біотехнологічного процесу, насамперед для збирання й аналізу інформації за показниками датчиків і зображення цієї інформації в легкій для сприйняття формі.

Таблиця 3.6. Величини та розрахункові параметри, що застосовуються для керування біотехнологічними процесами при ферментації

Параметри, що вимірюються	Розрахунки на основі вимірювань
Концентрація основних субстратів і продуктів у культуральному середовищі (цукри, спирти, органічні кислоти та ін.)	Продуктивність ($\text{кг}/\text{м}^3\text{год}$) Питома швидкість росту, μ (год^{-1}) Питома швидкість використання субстрату, q_s ($\text{кг}/\text{кг}$ біомаси за годину)
Концентрація ключових внутрішньоклітинних компонентів (ферменти метаболізму карбону, ключові метаболіти, АТФ, НАДФ та ін.)	Питома швидкість утворення продукту, q_p ($\text{кг}/\text{кг}$ біомаси за годину)
Концентрація біомас	Коефіцієнт економії (Y_p, Y_x)
Склад мікрофлори в культурі	Об'ємний коефіцієнт масопередачі за киснем, K_{vp} (год^{-1})
Концентрація розчинених O_2 та CO_2 в культуральному середовищі	Енергетичний вихід біосинтезу, η
Рівень і стан піни	Теплопродукція
Концентрація цільового продукту	Сумарні питомі витрати сировини

Розроблялись також системи автоматичної регуляції окремих параметрів (дозування середовища або його компонентів, стабілізація температури та рН середовища, швидкості протікання) за принципом контролю за зворотним зв'язком. Згодом цифрові технології стали використовувати для керування технологічним процесом загалом у складі автоматизованих систем керування (АСК). Завдання створення АСК набуло особливої актуальності при реалізації великотоннажних біотехнологічних процесів. Нині автоматизоване системне керування здійснюється на основі системного підходу і має багаторівневу ієрархічну структуру. Упровадження АСК дозволяє здійснити раціональне керування процесом біосинтезу. У результаті значно заощаджується вихідна сировина, електроенергія, вода, підвищується продуктивність процесу і праці обслуговуючого персоналу. Витрати на створення й упровадження АСК у біотехнології повертаються відносно швидко, упродовж трьох – чотирьох років експлуатації.

Звичайна схема контролю і керування ферментацією включає ферментер, датчики, регульовану систему, що реалізує розрахункові залежності на основі вимірювання параметрів процесу. Вихідні дані від датчиків надходять на комп'ютер, де оперативно аналізуються, у результаті надходять команди для виконавчих пристроїв і механізмів. Розробка й упровадження АСК для біотехнологічних процесів визначаються насамперед рівнем технічної оснащеності процесів і залежать від рівня електронного обладнання, засобів контролю й автоматизації.

Однак виникають проблеми внаслідок великої інформаційної ємності біотехнологічних процесів. Ефективність АСК залежить від швидкодії та обсягів пам'яті ЕОМ. Тому прогрес у сфері біотехнології значною мірою залежить від прогресу у сфері електроніки.

Моделювання є одним з найбільш значущих напрямів при розробці біотехнологічних процесів, оскільки за допомогою моделювання як експериментального, так і математичного, досліджуються і розробляються нові процеси, удосконалюються апарати й технологічні схеми виробництв.

При експериментальному моделюванні в лабораторних і промислових умовах зазвичай застосовуються моделі об'єктів і процесів, що відрізняються масштабами. Експериментальне моделювання дозволяє досліджувати й оптимізувати процеси, сутність яких мало вивчена. Такий підхід часто служить єдиним засобом для дослідження біотехнологічного процесу. Першим етапом експериментального моделювання є лабораторний, коли за відносно невеликих витрат вивчаються нові продуценти й розробляються нові процеси. Далі отримані результати переносять у дослідні, напівпромислові та промислові масштаби. На дослідних установках відпрацьовуються всі технологічні деталі майбутнього процесу, навчається персонал, створюється обладнання, уточнюються техніко-економічні показники. Потім проводяться широкомасштабні, дорогі промислові експерименти й випробування. Експериментальне моделювання має низку особливостей: трудомісткість, складність реалізації нової моделі процесу. Найскладнішими при цьому є питання масштабування технології й обладнання. Розвиток біологічних агентів пов'язаний не лише з поведінкою рідини й реагентів у ферментері, але й з їхнім власним метаболізмом. Тому масштабування в біології потребує спеціальних рішень, до яких дотепер немає єдиного підходу.

Для оптимізації та керування біотехнологічними процесами, крім експериментального, необхідно залучати математичне моделювання. Ці два підходи, доповнюючи один одного, дозволяють ефективніше розв'язувати поставлені завдання. Експериментальне моделювання часто передує математичному, слугуючи для нього джерелом інформації. Математичні моделі – зручний засіб узагальнення експериментальних даних. Наявність математичних моделей дозволяє більш обґрунтовано підходити до планування експериментів і обробки даних, істотно скорочуючи обсяг експериментальних робіт. Для моделювання і розрахунку біотехнологічних процесів унаслідок їх складності застосовують системний підхід. Математична модель складної біосистеми включає опис різних за природою об'єктів і явищ. Тому, аналізуючи біологічну систему загалом,

застосовують метод декомпозиції, розчленовуючи вихідну систему на низку підсистем: будують моделі масообміну, кінетики росту біооб'єкта і біохімічних процесів. Нині розроблено багато моделей масообміну, кінетики споживання субстрату й утворення різних продуктів. Найскладніше завдання – моделювання власне біологічних об'єктів, оскільки вони значно складніші за хімічні, фізичні й технічні. Об'єкти біотехнології здатні до саморегулювання, їхня складність підсилюється неоднорідністю. Процеси, що перебігають у біореакторі, залежать не лише від складних внутрішньоклітинних факторів, але й від умов зовнішнього середовища; у свою чергу, зовнішні процеси в біології пов'язані з внутрішніми, тому їх розділити не можна. Крім цього, на даному етапі рівня розвитку математичної біології відсутня теорія, адекватна сутності біологічних процесів. Поки що не створений математичний апарат, здатний описати природу біологічних перетворень у всій її різноманітності, тобто його необхідно розвивати й удосконалювати. Математичний опис біологічних об'єктів додатково ускладнюється їх недостатньою вивченістю. Тому на даному етапі можливий досить спрощений і наближений математичний опис біологічних об'єктів, цей напрям потребує істотного вдосконалення.

Оптимізація біотехнологічних процесів здійснюється на основі поєднання експериментального і математичного моделювання та застосування сучасних методів оптимізації (динамічного і нелінійного програмування, варіаційного обчислення). Однак на сьогодні для оцінювання оптимальності біотехнологічних процесів важко навіть підібрати належні критерії. При оптимізації в біотехнології необхідно враховувати обмеження, пов'язані з економічними й конструктивними умовами, можливостями контрольно-вимірювальної апаратури й засобів керування, екологічними вимогами тощо. Моделювання й оптимізація біотехнологічних процесів – завдання складне і багато в чому ще не розв'язане. Однак саме розробка адекватних моделей різних біотехнологічних процесів і створення на їх основі досконалих методів оптимізації та керування – найважливіший напрям біотехнології, без якого неможливий прогрес.

Запитання для самоконтролю

1. Які параметри радять контролювати при керуванні біотехнологічної ферментації?
2. Наведіть елементи узагальненої схеми контролю і керування ферментацією.
3. Які типи моделювання застосовуються в біотехнології?
4. Опишіть етапи експериментального моделювання.
5. У чому складність математичного моделювання біологічних об'єктів?
6. Які обмеження слід урахувати при оптимізації в біотехнології?

3.5. Експериментальні роботи з оптимізації процесу очищення цільового біотехнологічного продукту

Метою експериментального розрахунку для оптимізації є:

- визначити фактори, які будуть впливати на розділення;
- мінімізувати неконтрольовані фактори;
- розрізнити й розрахувати вплив різних факторів.

Найважливішим факторам системно задають різні значення для визначення оптимальних умов очищення. Такі дослідження проводяться в малому масштабі з метою економії часу й засобів. У процесі оптимізації є значна кількість змінних, що потребують дослідження. Для іонообмінної хроматографії, наприклад, необхідно досліджувати:

- іонну силу;
- рН;
- об'єм градієнта;
- ступінчастість градієнта;
- склад рухомої фази;
- завантаження зразка;
- швидкість потоку;
- температуру;

- об'єми для врівноважування;
- процес завантаження зразка;
- відмивання;
- елюцію продукту;
- розміри колонки;
- різні іонообмінні середовища.

Масове навантаження, чистота й видобуток продукту є ключовими параметрами для визначення допустимих інтервалів для всіх цих змінних. Оптимізацію найкраще проводити, беручи до уваги кінцеву мету процесу, щоб успішно застосувати стратегію для збирання необхідної інформації з мінімальною затратою зусиль. Використана стратегія буде відрізнятися залежно від того, наскільки добре відомі спосіб розділення і властивості зразка. У деяких випадках оптимізація може проводитися просто шляхом добору важливих змінних (на основі раніше надбаного досвіду і/або на теоретичній основі) та їх зміни відповідно до загальноприйнятої практики, а також оцінювання хроматограми за результатами зібраних фракцій для подальшого аналізу.

Кількість експериментів може бути зменшена шляхом використання факторного розрахунку замість зміни однієї змінної щоразу. При факторному розрахунку змінні змінюються одночасно, але контрольовано, а інформація узагальнюється з відмінностей отриманих сигналів. Критичними точками в експериментальному розрахунку є вибір факторів, які найкраще підходять, і досліджуваного інтервалу. Розрахунок експерименту має ґрунтуватися на сигнальній хеометрії (наприклад для виявлення систематичних помилок або одночасних змін). Якщо які-небудь із цих передумов не виконуються, то результат може бути марним або, що небезпечніше, оманливим. Правильний розрахунок може бути підтверджений завдяки більшій кількості повторів, якщо потрібно більше інформації, тоді як помилковий розрахунок є лише дарма витраченим часом. Оскільки найскладнішим періодом для розрахунку експерименту є його початок, коли

відомо найменше даних, то правильна стратегія – проведення попереднього дослідження для одержання деякої основної інформації до початку великого дослідження, особливо якщо змінні або їхній вплив на розділення маловідомі.

Експериментальний розрахунок має виконуватися з використанням стандартних підручників зі статистики, однак оцінювання результатів потребує відповідного програмного забезпечення. У літературі описано низку підходів з використанням у біотехнології статистичного розрахунку. Дворівневий дрібний факторний розрахунок зменшує кількість експериментів із 60 до 8. Статистичний експериментальний розрахунок може бути використаний для визначення надійності катіонообмінної стадії для рекомбінантного інтерлейкіну людини, де у 16 експериментах оцінювалося 5 факторів, а результати аналізувалися за допомогою статистичного пакету програмного забезпечення. Були визначені чистота і видобуток. Установлено, що на видобуток значно впливають умови елюції й відмивання, а також питома провідність, рН промивного буфера і його об'єм. Вихід цільової молекули збільшується, коли провідність при елюції збільшується, а рН промивного буфера і його об'єм зменшуються. Фахівці дійшли висновку, що дворівневий факторний розрахунок є ефективним способом визначення надійності, що вони зможуть перевірити п'ять основних ефектів і десять взаємодій, які можуть відбуватися двома шляхами, за малої кількості експериментів. Більше того, ці експерименти надають інформацію про параметри, які можуть викликати мінливість процесу, тобто елюцію й умови промивання. Такі типи досліджень закладають основу для подальшої валідаційної роботи.

Оптимізація. Для досліджень із оптимізації підбираються параметри, що зумовлюють основний вплив на процес очищення. Оптимальні умови визначаються шляхом дослідження меж, у яких спостерігається відповідь, тобто у k -вимірному просторі, де k – кількість параметрів. Оскільки практично неможливо провести достатню кількість експериментів для одержання необхідної інформації, то треба визначити деякі математичні залежності між відповіддю і

параметрами на основі обмеженої кількості експериментів. Інший підхід полягає в систематичній зміні параметрів з метою максимального збільшення відповіді, наприклад шляхом простої оптимізації. Для обох підходів є промислові варіанти програмного забезпечення. Оскільки оптимізація, заснована на інтерполяції, може дати нереальні результати, то важливо, щоб запропонований оптимум перевірявся експериментально. Крім того, поверхня, що відповідає, повинна мати локальні оптимуми, тому оптимізацію (наприклад просту) необхідно проводити з використанням різних вихідних величин. Один із прикладів того, як експериментальний розрахунок може бути використаний для оптимізації бактеріальної клітинної культури при виробництві вакцини в гіпотетичному експериментальному розрахунку, було описано раніше. Дві з одинадцяти домішок у середовищі росту клітин були визначені як важливі шляхом скороченого факторного розрахунку. Прийнятні робочі інтервали параметрів потім були визначені з відповідей, отриманих при проведенні додаткових експериментів. Було зазначено, що отримана інформація може бути використана для того, щоб сприяти валідації процесу. Однак передумовою такого підходу є те, що для поверхні, яка відповідає, локальні оптимуми й мінімуми між точками даних, отриманих експериментально, відсутні. Велике відхилення вимагає щільнішої вибірки даних. Складно дати чіткі інструкції з експериментальних параметрів, які мають варіювати при оптимізації. Межі дуже сильно залежать від мети поділу, об'єму, складу РЦП тощо.

Метод пошуку. Проведення експериментів, необхідних для оптимізації, спрощується, якщо хроматографічна система має програмне забезпечення пошуку. Таке програмне забезпечення включає шаблони/матриці методу, де величини параметрів можуть довільно змінюватися, а експерименти – проводитися без особистої участі користувача. Цей метод часто використовується, коли вирішальні/важливі параметри добре відомі, а оптимізація здійснюється шляхом зміни одного параметра за один раз. Шаблони/матриці однаково корисні для експериментів, заснованих на факторному

розрахунку. Стратегія, що припускає використання картриджів для методу пошуку, може прискорювати/полегшувати процес розробки (наприклад, попередньо заповнені колонки ємністю 1 і 5 мл з іммобілізованим гепарином були використані для швидкої дрібномасштабної оптимізації очищення антитромбіну III із плазми бика).

Моделююче програмне забезпечення для оптимізації.

Розробка дослідження з оптимізації може бути підтверджена залежностями, виведеними на підставі теорії хроматографії. Існує промислове програмне забезпечення, розроблене для оптимізації хроматографічних методів. У випадку лабораторної практики передбачається, що моделююче програмне забезпечення буде складником хроматографічної системи для того, щоб полегшити розробку методу.

Остаточна розробка процесу очищення. Коли оптимізовані різні стадії, доцільним може бути зібрати процес (принаймні на папері) і ретельно дослідити розробку з метою оцінити потенційні вдосконалення на ранній стадії. Тут надзвичайно важливим є підключення промислового персоналу. Як зазначалося раніше, важливо оптимізувати весь процес очищення й навіть увесь процес виробництва загалом, щоб уникнути субоптимізації різних стадій. "Вузькі місця" і дорогі частини (за часом, матеріалом чи працезатратами) можуть потребувати перерахування процесу, де обмежуючі фактори можуть бути усунуті або зменшені на більш ранній чи пізній стадії.

Як зазначалося раніше, наявність і тип домішок можуть впливати на порядок і тип методів очищення (дуже гідрофобні забруднюючі речовини, високий вміст солі тощо), а при оцінюванні кінцевої розробки може бути виявлено, що вигідніше видаляти небезпечні домішки нехроматографічними методами. Розробка також має бути проаналізована щодо можливих причин забруднення і його усунення. Наявність органічних розчинників і висококонцентрованих розчинів солей може значно підвищити виробничі витрати. У таких випадках розробка всього процесу має мінімізувати витрати на обробку відходів. Переробка органічних відходів (після очищення і контролю якості) має бути виправдана тривалим

використанням, якщо це можливо. Під час розробки збирається велика кількість інформації, яка на додаток до раніше отриманого досвіду забезпечує інструкції для вибору контрольних точок, необхідних для гарантії того, що процес очищення перебігає так, як очікувалося. Це – спільне завдання персоналу, зайнятого виробництвом і розробкою. Хемометрія використовується також для одержання інформації з даних (наприклад, аналіз тенденції). Один із засобів – багатоваріантний аналіз даних, який може бути використаний для класифікації серій даних. За допомогою цього методу дані різних вимірювань (пов'язані з процесом, але необов'язково ті, що можна легко пояснити/інтерпретувати, наприклад NIR – аналіз в ділянці спектра, близькій до ІЧ) збираються, уводяться в програмне забезпечення та порівнюються з еталонною серією. Еталонна серія складається з даних для процесу, який забезпечує виробництво продукту затвердженням способом. Із процедури оптимізації встановлюють допустимі зміни критичних параметрів. Ці параметри потребують контролю і часто перевіряються у процесі, наприклад шляхом вимірювання рН, провідності, швидкості потоку, перевірки положення насоса тощо. Процес може безупинно контролюватися з використанням спектроскопії, шляхом реєстрації провідності, рН, швидкості потоку і тиску, щоб упевнитися, що ці параметри не відхиляються від затверджених меж.

Метою фази розробки є створення стабільного і надійного процесу й одержання точок перевірки, необхідних для того, щоб упевнитися, що кінцевий продукт відповідатиме заданим вимогам. Таким чином, за ідеального сценарію тестування кінцевого продукту не буде потрібним. Це є основою для параметричного виходу, у якому випуск партії фармацевтичного продукту заснований на представленому ефективному контролі, реєстрації й документуванні валідованого виробничого процесу. Однак параметричне отримання вимагає, щоб взаємозв'язок між усіма важливими змінними процесу і контролю був добре відомий. Деякі методи, розроблені впродовж стадії розробки для характеристики очищеного продукту, будуть валідуватися і

використовуватися для контролю якості цільового продукту. До ухвалення рішення про збільшення масштабу до виробничих обсягів кінцевий користувач повинен упевнитися, що хроматографічні сорбенти, які характеризуються мінливістю від партії до партії, не будуть впливати на процес. Відповідність має бути у межах припустимого інтервалу розміру часток, пористості та ступеня заміщення для адсорбційних методів. Якість функціональної групи й чистота базової матриці мають відповідати вимогам кінцевих користувачів. І, нарешті, сорбенти мають бути наявні в кількостях, необхідних для широкомасштабного процесу. Показники погіршення сорбентів включають підвищений перепад тиску за постійної швидкості потоку, зміну профілю елюції, знижений вихід продукту; зміну ширини та/або асиметрії піка, а також профілю повторного врівноважування (на що вказують рН, провідність або УФ). Якщо експлуатаційні характеристики не можуть бути відновлені шляхом звичайних методів очищення колонки, то досліджуваний хроматографічний сорбент може бути непридатний для широкомасштабного виробничого процесу. Робота з розробки виконується переважно на колонках і апаратурі, що відрізняються за конструкцією від тих, які використовуються при великомасштабних процесах. Перед ухваленням рішення про збільшення масштабу необхідно оцінити вплив різних конструкцій (конструкції розподільника колонки, діаметри трубок, принципи приготування буфера, час утримання, положення детектора, час відгуку тощо). Програмне забезпечення для контролю процесу і реєстрації має бути повністю валідоване. Є промислові версії програмного забезпечення, які можуть використовуватися на різних стадіях процесу розробки, від відкриття до повномасштабного виробництва.

Запитання для самоконтролю

1. Які параметри є ключовими для визначення допустимих інтервалів змінних при оптимізації?
2. Який етап експерименту є найскладнішим для розрахунку?

3. Який спосіб розрахунку надійності етапу очистки на сьогодні визнано ефективним?
4. Поясніть, чому доцільно оптимізувати весь процес виробництва, а не кожен його етап окремо.
5. Що таке еталонна серія і навіщо вона потрібна при оптимізації?
6. Наведіть показники погіршення якості сорбентів.

3.6. Пілотні заводи.

Поетапна та послідовна розробка технології

За останні п'ятдесят років методи й обладнання біологічної науки зазнали істотних змін. Використання результатів біології у виробництві, стрімке зростання прибутку від виробництва та продажу лікувальних засобів і продуктів, отриманих від рекомбінантних джерел, стимулюють інвестиції в розвиток нових біотехнологій. Це стосується не тільки сучасних, рекомбінантних розробок (хоча саме вони й були основним стимулом), а й традиційних технологій. Методи та інженерні підходи, що були розроблені або вдосконалені для використання в біологічній науці, були швидко комерціалізовані, масштабовані й упроваджені в широке виробництво.

Характерною ознакою ери біотехнології стало поєднання наукового й виробничого процесів. Виробництво, маючи вільні фінансові ресурси, почало замовляти науковий результат і його впровадження в технологію. З іншого боку, розробники технологій, потрапивши під фінансовий контроль виробництва, були змушені доводити кінцевий результат (цільовий продукт, технологію) до таких рівнів якості, які б задовольнили не тільки замовника-виробника, а й усі регламентуючі та дозвільні організації.

Отже, виникла потреба в пізнанні самої суті біотехнологічного процесу, можливих моделей його розробки, взаємодії розробників між собою, зовнішнім науковим і споживчим середовищем. Спочатку треба зрозуміти,

сформулювати поняття перехідної ланки між лабораторною розробкою та широкомасштабним виробництвом, а потім створити суб'єкт початкового біотехнологічного виробництва з усіма ознаками промислового заводу.

Розробку будь-якого біотехнологічного процесу можна представити як низку послідовних етапів:

- 1) лабораторна робота з одержання продуцента, опрацювання умов його культивування та методів очищення продукту;
- 2) адаптація лабораторних методик до технологічних вимог;
- 3) масштабування методик;
- 4) оптимізація процесу;
- 5) формуляція продукту;
- 6) валідація.

Лабораторну роботу з одержання продуцента, опрацювання умов його культивування та методів очищення продукту організовують за звичною схемою науково-дослідної установи. Великі фармацевтичні компанії утримують власні лабораторії, більшість же надає перевагу розміщенню замовлень на дослідження в університетах або науково-дослідних інститутах. Єдиною вимогою до таких досліджень є дотримання вимог *Good Laboratory Practice* (GLP), щоб не виникало проблем з подальшою валідацією технології.

Загальноприйнятою практикою у країнах із розвиненою біотехнологією є розробка технології від замовника, коли спеціалізована фірма визначає потребу ринку в тому чи іншому продукті й розміщує замовлення на розробку технології його отримання у відповідній лабораторії. Зацікавлена у продукті фірма фінансує розробку, завдяки чому якість роботи не потерпає від недофінансування, і проводить попередній маркетинг, який дає змогу конкретизувати вимоги до продукту (необхідна чистота, припустимі домішки, гранична собівартість тощо).

Водночас цільова розробка технології під замовлення дає змогу дотримуватися певних вимог, які можуть значно полегшити подальше впровадження, а саме:

- використовувати економічно найвигідніші матеріали та сировину;
- оптимально узгодити етапи;

- урахувати наступну валідацію та можливості масштабування під час проектування процесу;
- реєструвати й накопичувати результати у формі, яку легко читати;
- одночасно розробити аналітичні методи контролю якості сировини та продукту;
- використовувати універсальне обладнання.

Оптимальна розробка етапу upstream відіграє дуже важливу роль. Не слід обирати буферні речовини, знешкоджуючі речовини й різні домішки, наприклад детергенти чи стабілізатори, небажані у виробництві терапевтичних або діагностичних препаратів. Бажано відмовитись від матеріалів, для яких відсутні тести на ідентичність або методи аналізу. Особливу увагу слід звернути на те, щоб кількість матеріалу від продуцента була достатньою для виробництва.

У схемі очищення біотехнологічного продукту мають бути задані кількість і послідовність стадій етапу downstream. Необхідно визначати чистоту продукту та відсоток вилучення активного матеріалу на кожній стадії. Параметри процесу, а саме швидкість потоку, питома провідність, рН, і час контакту для очищення мають бути зареєстровані та, де це можливо, визначені як інтервал, який може бути звужений після накопичення досвіду.

Команда дослідників має обирати хроматографічні носії, придатні для масштабування процесу. Схему очищення слід розробляти з урахуванням валідації процесу, а дані, що доповнюють проект, мають бути представлені у форматі, який легко читається. Критерії для вибору хроматографічних носіїв включають механічні властивості, які визначають здатність їх до масштабування, можливість очищення та санітаризації лугами по місцю використання й урахування паспортної кількості гарантійних циклів роботи. На будь-якій стадії слід досягати однакової лінійної швидкості потоку за всіх масштабів з тим, щоб можна було отримати однакові профілі чистоти. Очищення хроматографічних носіїв є важливим як з огляду на контроль, так і з погляду економічної перспективи. Сучасні хроматографічні носії мають відповідати умовам, які необхідні

для забезпечення повної регенерації та санітарної обробки. У разі використання нестійких лігандів, наприклад моноклональних антитіл, необхідно передбачити стадію очищення від можливої контамінації ними. Загалом, хоча в лабораторних умовах ідеальної селективності можна досягти використанням афінних носіїв, наприклад імуносорбентів, їх варто уникати через проблеми з довговічністю сорбенту та його санітаризацією. Якщо уникнути використання нестійкого носія неможливо, то слід розробити методи виявлення можливих контамінантів, причому це мають бути такі методи аналізу, які можна проводити безпосередньо в розчині продукту. Особливо важливим є аналіз афінних носіїв з білковими лігандами й основних матриць, у яких можуть бути токсичні речовини. Під час вибору методів санітаризації не варто забувати, що способи очищення і наявність лужних речовин впливають на термін роботи колонки.

Обладнання, яке використовує науково-дослідний відділ, має бути універсальним і забезпечувати накопичення/збирання та зберігання даних. Результати, зібрані науково-дослідним відділом, мають бути представлені звітом з розробки, що однаково важливо як для передачі технології на виробництво, так і для ознайомлення з нею інспекторів-контролерів. У звіті необхідно посилатися на дані, які зареєстровано в лабораторних журналах. Пізніше ці дані можуть стати у пригоді для іншого персоналу. Необхідно використовувати офіційні методи контролю розробки процесу, тому що дані з дослідження та розробки продукту мають надходити в адміністрацію з харчових продуктів або лікарських препаратів, щоб стати основою для валідації процесу. Офіційними методами контролю є лише ті, які затверджено відповідними законодавчими актами чи відомчими інструкціями. Така вимога необхідна для забезпечення можливості незалежного контролю якості продукту.

Сказане не означає відмову від найсучасніших тестів контролю якості проміжних і кінцевого продуктів, оскільки правильне використання аналітичних методів забезпечує одержання інформації, необхідної для оптимізації

біотехнологічного процесу та прийняття рішення безпосередньо в його ході. Необхідно використовувати всі методики, які дають можливість аналізувати речовини за різними фізико-хімічними властивостями. Вибір адекватних аналітичних методів визначає успіх усього процесу.

Поняття адекватності, повторюваності, методичності слід поширювати на всі процедури, які треба виконати протягом лабораторної розробки. Наприклад, якщо результати хроматографічної стадії очищення одержано на колонці, яка не була певним чином очищена чи регенерована, то ці дані не надійні для визначення чистоти продукту в елюаті та параметрів процесу. Якщо науково-дослідний відділ не працює у відповідних умовах або не реєструє результати як слід, то продукт, виготовлений у науково-дослідному відділі для дослідження безпеки на тваринах, може відрізнитися від продукту, одержаного під час масштабування. Це може призвести до необхідності повторення дуже дорогих досліджень безпеки продукту.

Отже, компанії, які закладають витрати на валідацію та масштабування у процес виробництва, мають найкращий шанс уникнути затримки під час валідації та налагодження виробництва. Процес, розроблений дослідницьким відділом, має бути спроектований таким чином, щоб команда масштабування могла його зрозуміти та прийняти. Альтернатива ж, запропонована сучасною організацією академічної науки, полягає в тому, що науково-дослідницький відділ не націлений на результат виробництва і безвідповідально перекидає науково опрацьований процес на етап масштабування, де вже інша команда змушена починати роботу з перенесення його у виробництво від самого початку. Така послідовність найвитратніша з усіх можливих схем і потребує додаткового етапу адаптації лабораторних методик до технологічних вимог.

Масштабуванням називають процес переведення лабораторного методу, характеристикою якого є використання незначних об'ємів сировини й одержання невеликої кількості продукту, у промислову технологію, яка оперує значними кількостями сировини та продукту. Лабораторна методика,

навіть повністю адаптована до технологічних вимог, є лише "чернеткою" технології. Помиляються ті, хто вважає, ніби нарощування об'ємів є лише арифметичним множенням необхідних матеріалів. На всіх етапах і стадіях біотехнологічного процесу під час масштабування необхідно розв'язувати низку проблем із заміни методичних підходів (заміни культурального середовища під час переходу з лабораторних матрасів до ферментерів, зміни умов центрифугування на проточних центрифугах тощо) і адаптації інших методів (наприклад, під час масштабування хроматографічних стадій зміна довжини колонки може спричинити необхідність коригування умов нанесення чи елюції).

Загалом коригування умов проведення процедур є найпоширенішим під час масштабування, і фахівці, здатні за зміною виходу чи властивостей продукту визначити "вузьке місце" методики та напрям її корекції, цінуються дуже високо. Причому завжди слід пам'ятати, що в біотехнологічному процесі немає дрібниць і незначних стадій. Як ілюстрацію можна навести приклад із практики. Під час масштабування проекту очищення певного білка з лізату продуцента розв'язати проблему "забивання" колонки вдалося, лише вдвічі збільшивши тривалість інкубації лізату із ДНКазою за однакової концентрації ферменту порівняно з лабораторними умовами. Виявилося, що збільшення об'єму лізату певним чином впливає на швидкість оборотів ферменту.

Зазвичай розробку лабораторної методики виконують із мінімальною кількістю сировини в мінімальних об'ємах. Такий підхід дає змогу мінімізувати витрати на розробку, а в деяких випадках, коли йдеться про плазму крові людини, і знизити непродуктивні втрати цінного матеріалу. Для полегшення мінімізації багато виробників обладнання випускають пробірки типу "епендорф", багатокоміркові планшети, центрифуги для таких пробірок і планшетів, хроматографічні колонки об'ємом 1 мл тощо. Масштабування здійснюють багаторазовим повторенням усіх процедур з покроковим збільшенням об'ємів у 5–10 разів. Розмір кроку встановлено емпірично, розширення його призводить до

ускладнення визначення необхідного коригування, звуження – до перевитрат часу, матеріалів і коштів. Проте з деякими білками звуження кроку стає необхідним.

Значно спростити масштабування деяких стадій, зокрема хроматографічних, може уніфікація обладнання. Принаймні якщо дослідник у лабораторії та під час масштабування та інженер на широкомасштабному виробництві працюють відповідно на лабораторному, пілотному й промисловому обладнанні одного виробника, який має сертифікат ISO 9000-9004, то це гарантує масштабування (Scaling up) процесу від лабораторного до промислового майже без проблем.

Поняття пілотного заводу. Біотехнологічний процес органічно складений із двох складових – лабораторного дослідження з метою одержання продукту або продуцента та промислового виробництва. Оскільки на сьогодні лабораторне дослідження у світовій біотехнології здебільшого фінансує фірма-виробник, то біотехнологічний процес на обох етапах поєднано наскрізним планом, який складають за такою схемою:

1. Авторська ідея, формулювання можливості цілеспрямованого перенесення певного наукового знання у виробничу практику або замовлення на розробку технології.

2. Розробка та реалізація лабораторного методу одержання продукту від біологічного об'єкта.

3. Дослідження лабораторних зразків на токсичність, біологічну активність, сумісність з організмом, який використовуватиме цей продукт.

4. Масштабування методу з добором найприйнятніших (якісних, фінансових тощо) технологічних умов і технічної апаратури.

5. Проведення попередніх економічних розрахунків доцільності виробництва продукту з урахуванням потреби ринку або критичної необхідності.

6. Створення пілотної лінії для відпрацювання технології, розробка методів контролю виробництва та якості продукту, одержання обмежених партій препарату, достатніх для визначення кінцевої форми його використання в медико-біологічних дослідженнях.

7. Патентування чи розробка документації ноу-хау. Поняттям *ноу-хау* (know-how, у перекладі – "знаю як") позначають оригінальні технології та знання, розроблені авторами методу чи технології, але не запатентовані, а захищені комерційною таємницею. В економіці високих технологій ноу-хау є значною частиною активів компанії. Відповідно ноу-хау є об'єктом інтелектуальної власності.

8. Одержання необхідної дозвільної документації на виробництво й використання продукту (валідація).

9. Проведення повного маркетингу з визначенням доступності та вартості сировини, потреби ринку в продукті й можливості залучення партнерів, зацікавлених у виробництві чи організації збуту продукту. Маркетинг є основою формування бізнес-плану та залучення інвестицій на його основі.

10. Розробка плану продажів.

11. Проведення рекламної кампанії.

12. Створення промислової лінії для виробництва продукту.

Зрозуміло, що авторська ідея разом з розробкою лабораторного методу і випробуванням лабораторних зразків цілком поєднуються з науково-дослідною роботою в НДІ або на університетській кафедрі, а промислове виробництво і продаж препарату знаходять місце на заводі й у торгівлі. Що стосується середньої частини схеми й, мабуть, найголовнішої її частини, то суб'єкт, відповідальний за її реалізацію, повинен, з одного боку, бути частиною науково-дослідної структури, а з іншого – мати практично всі заводські атрибути.

Проблеми масштабування, оптимізації виробництва та валідації неможливо розв'язати на рівні лабораторної розробки технології. Водночас зупинка технологічних ліній великомасштабного виробництва на період проведення цих етапів коштує занадто дорого. Саме розривом між науковим і технологічним ланцюжками можна пояснити велику різницю між кількістю запатентованих і фактично впроваджених у виробництво інновацій. У сучасному світі ця проблема була розв'язана формулюванням концепції пілотного заводу.

Пілотний завод (ПЗ) – це напівпромислове виробництво інноваційного продукту з використанням напівпромислового чи промислового обладнання. Його метою є масштабування технологій, оптимізація процесу виробництва, випуск обмежених партій продукту, необхідних для його валідації, проведення початкового та кінцевого маркетингу, просування продукту на ринок до моменту передачі технології на спеціалізоване великомасштабне виробництво.

Причини включення ПЗ у схему розробки біотехнологічного виробництва:

- велика кількість лабораторних методів, що запропонована для одержання різних продуктів;
- недостатня кількість (або повна відсутність) промислових досліджень і технологічних розробок (R&D);
- недостатня кількість (або повна відсутність) стратегій виробництва;
- погано сплановане перенесення технології з лабораторії до виробництва та неприйнятний розподіл відповідальності між виконавцями.

З огляду на мету пілотного виробництва можна сформулювати критерії його організації:

- організація приміщень за принципом великомасштабного виробництва;
- використання обладнання, максимально наближеного за характеристиками до того, яке будуть використовувати під час виробництва;
- надлишок різноманітного аналітичного обладнання з метою максимального документування виробничого процесу;
- вищі вимоги до професійної підготовки персоналу, ніж на виробництві.

З наведеної схеми видно велике значення в біотехнологічному процесі пілотного виробництва. Певним аналогом пілотного виробництва в радянські часи було створення у складі науково-дослідних інститутів дослідно-промислових виробництв (ДПВ), проте їхня структура не відповідала третій і четвертій вимогам до пілотного заводу.

Проте організація пілотного виробництва для одного препарату теж не дає очікуваного ефекту. Унаслідок вищої собівартості продукту пілотне виробництво на ринку завжди програватиме великомасштабному. Пілотний завод або пілотна лінія на великомасштабному виробництві для успішного функціонування мають володіти такими властивостями:

1. Пілотний завод має використовувати максимально наукомісткі технології, які протистоять конкуренції та приносять дохід.

2. Пілотний завод має бути самоокупним, найкраще – прибутковим, для цього на ПЗ слід мати, крім експериментальної, виробничу пілотну лінію з випуску економічно вигідного конкурентоспроможного препарату, спрямовуючи прибуток на фінансування розробки наступної технології чи препарату. Іншими словами, конкурентоспроможність ПЗ полягає в можливості швидкої заміни технологій і переформатування виробничих ліній з тим, щоб виходити на ринок з новими продуктами та подальшим продажем технології потужним виробникам.

3. Пілотний завод мусить підтримувати постійний зв'язок з науковими інституціями для того, щоб оперативно реагувати на нові наукові розробки, а в деяких випадках замовляти розробку потрібних технологій, виходячи з аналізу потреб ринку.

Починаючи з четвертого пункту плану створення біотехнологічного виробництва (масштабування), подальшу розробку технології економічно доцільніше проводити на пілотному заводі. Отже, ПЗ, або контрактний розробник (якщо пілотний завод не інтегровано у структуру фірми), є основною структурною та функціональною одиницею біотехнологічного процесу.

Головними завданнями пілотного заводу є:

- 1) виробництво клінічних партій продукту;
- 2) розробка технологій для нових продуктів;
- 3) упровадження процесів технологічної підтримки існуючих на ринку продуктів;
- 4) виробництво матеріалів біологічного походження (не призначених для клініки) для проведення фундаментальних

досліджень, таких як скринінг, аналізи та вивчення механізмів захворювань.

На відміну від хімічних, фармацевтичні пілотні заводи використовують не тільки для масштабування лабораторних процесів, а й для виробництва певних партій розроблених біологічних субстанцій для тестування на безпеку, токсичність, проведення клінічних досліджень і рекламної кампанії, перевірки потреб ринку. Для пілотних заводів, асоційованих із лабораторією-розробником, додатковою метою є виведення продукту на ринок і реклама технології перед фармацевтичними фірмами. Отже, ключовим питанням функціонування пілотного заводу є балансування між масштабуванням / дослідницькими розробками та виробництвом продукції для клінічного тестування та ринку.

Однією з головних цілей пілотного заводу є збирання експериментальних даних основних етапів певного технологічного процесу за допомогою максимальної кількості способів. Отже, значна частина капіталовкладень у конструювання пілотного заводу припадає на сучасне, високоточне контрольне обладнання різного принципу дії. Традиційно до безперервного моніторингу процесу залучені іонометри, термометри, контролери швидкостей мішалок, швидкості потоку повітря і газів, манометри, індикатори піноутворення, датчики об'єму та маси фракцій, мас-спектрометри, фотометри та ін. Нині часто використовують біосенсиори, які визначають рівні вуглекислоти, глюкози, пестицидів тощо.

Для збирання та керування даними під час експериментальних досліджень на пілотному заводі одним із критичних параметрів є інтервали між контрольними замірами, які залежать від природи етапу технологічного процесу. Зокрема, для ферментації тваринними клітинами інтервал виміру швидкості накопичення вторинного метаболіту може бути 15–20 хв, але під час культивування бактерій або дріжджів він має бути коротшим і становити 5–10 хв. Зазвичай п'яти- або десятихвилинні інтервали контрольних вимірів прийнятні для операцій

центрифугування та мікрофільтрації. Проте, залежно від важливості операції, можуть бути застосовані менші інтервали збирання даних. Для хроматографії збирання даних у формі хроматограми відбувається безперервно. Дані, одержані в режимі реального часу, зазвичай архівуються на спеціальному сервері в певним чином організованій базі даних, відповідно до встановленої стандартної операційної процедури (СОП) для архівування таких даних.

Оскільки етапи роботи з технологією можуть дещо модифікуватися, то пілотний завод має адаптувати свої можливості для повноцінної роботи. Відповідно рішення мінімізувати виробничі чи складські площі пілотного заводу з метою економії засобів може призвести до надмірних витрат під час роботи або навіть унеможливити досягнення результату. Деяке перевищення потужності установок підготовки води та повітря, наявність вільних площ і обладнання забезпечить певну функціональну гнучкість пілотного заводу. Добір портативного обладнання дасть змогу його оперативно переміщувати між виробничими приміщеннями для використання в нових процесах. Найефективніший підхід для збільшення універсальності – компонування систем зі зв'язаних і об'єднаних модулів. Модулі добирають відповідно до технологічних потреб, їх можна швидко перекомутувати, формуючи виробниче підприємство, готове до валідації.

Окремо слід наголосити на необхідності регулярної метрологічної перевірки з тим, щоб дані всіх аналітичних приладів були максимально точними. Якщо на великих підприємствах допустимими є відхилення точності вимірів у межах заданого діапазону, то на пілотному заводі така практика неприпустима. Функція пілотного заводу полягає в опрацюванні технології та її оптимізації, отже, збирання максимально точних даних, навіть у дещо більшій кількості, ніж потрібно для виробництва, є першочерговою потребою. Щоправда, якщо використовувати сучасне обладнання, виготовлене за вимогами *Good Laboratory Practice \ Good Manufacturing Practice* (GLP\GMP), то калібрування можна проводити дещо рідше, оскільки в таких

приладах передбачено функцію самотестування й самокалібрування під час запуску з виведенням результатів на документувальні пристрої. Документування всіх типів робіт, стану обладнання, внесених змін у регламент технології тощо має бути обов'язковим, максимально повним і точним.

Потреби в персоналі на виробництві зазвичай визначають, виходячи з потреб забезпечення певного процесу, проте на пілотному заводі різні виробничі процеси постійно розробляються і модифікуються. Відповідно кількість персоналу в розрахунку на одиницю виробленої продукції тут має бути дещо більшою, ніж на звичайному виробничому підприємстві. До операційного штату потрібно включити, крім технічного персоналу, ще й групу розробки технології. До групи керування пілотного заводу треба ввести також фахівців з розробки стандартних операційних процедур (СОПів), технічного обслуговування та контролю проміжних продуктів.

Термін *Standard Operating Procedures* (SOP) з англійської зазвичай перекладають як *стандартні операційні процедури*, хоча за значенням правильніше було б казати *правила – документи*, у яких детально викладено хід виконання певних процедур. Частина з цих документів може бути складена до, частина – у процесі, а частина – тільки після завершення розробки технології на пілотному заводі. Типові категорії документів містять СОПи з функціонування обладнання, очищення виробничого приміщення й обладнання, відбору зразків, стерилізації, санітаризації, технічного обслуговування та порядку документування переходу на резервний продукт, контролю змін і опису партій продукту. СОПи мають бути чіткими й однозначними, щоб очікуваний результат їх виконання був гарантований. Кількість СОПів на певну процедуру має бути зведена до мінімуму з метою запобігання розбіжності результатів роботи. Усі головні зміни СОП необхідно реєструвати, оцінити їхній вплив на валідацію та передати в контролюючий орган.

Кожен співробітник пілотного заводу має періодично проходити необхідні та спеціально для нього розроблені програми навчання, базовані на потребах технологічного процесу. Початкове навчання має бути послідовним і

починатися з найпростішого. Для досягнення кращих результатів навчання варто проводити з використанням письмової документації, якщо вона дозволена для співробітників, що навчаються. Поточне навчання здійснюють регулярно, кожні один або два місяці, що вважається найприйнятнішим для активно працюючого пілотного заводу. Навчання повинні проходити робітники, оператори, інженери, фахівці з технічного обслуговування, персонал, який проводить валідацію та контролює виконання GMP. Програми навчання, присвячені вивченню технологічного процесу, мають зосереджувати увагу на критичних етапах і обладнанні, проводити огляд СОПів, розгляд правил техніки безпеки персоналу тощо.

Для забезпечення валідації ведення документації виробничого процесу вимагає дотримання двох головних правил:

1) усі аналітичні (терези, спектрофотометри, хроматографи, іонметри тощо) та обслуговуючі (холодильники, низькотемпературні камери, центрифуги, вакуумні, сушильні апарати тощо) системи обов'язково мають бути обладнані приладами реєстрації результатів вимірювань або параметрів роботи (записи є невід'ємною частиною документації);

2) навіть найменша зміна процесу виробництва або обладнання (наприклад заміна хроматографічної колонки) потребує дозволу технічної ради підприємства, а всі папери, від заяви майстра цеху до рішення ради, є невід'ємними частинами загальної документації. Отже, навіть заміна несправного обладнання на аналогічне за класом має бути відображена документально.

Поетапна розробка. Найпростішим рівнем організації розробки є співпраця дослідної установи, пілотного заводу та великомасштабного виробництва, які є незалежними структурами з власними технічними й фізичними ресурсами, роздільною відповідальністю. Такий тип організації є доволі неефективним унаслідок відсутності постійного зв'язку між групами, що розробляють технологію. Найчастіше в таких випадках технологія передається іншій групі без взаємозв'язку. Кожний відділ стає функціональною одиницею на шляху розвитку продукту від першої фази до наступної, водночас

кожний наступний елемент не втягується в процес, доки наступна фаза розробки не досягне його відділу. За такої організації задовільного результату можна досягти лише у випадках співпраці фірм із високорозвиненою технологією.

Для цієї моделі характерні наявність або поступове виникнення багатьох проблем. За поетапної розробки процес розробляють із позиції залученої групи з урахуванням потреб лише наступної групи. Відповідно ігнорування першою групою інтересів третьої групи перешкоджає оптимізації розробки. Більше того, неоптимальний вибір методів на початкових етапах розробки може спричинити серйозні технологічні ускладнення під час розробки кінцевих етапів, навіть унеможливити її.

Головними проблемами поетапної розробки є:

- 1) надлишок лабораторних методів, запропонованих для одержання продукту;
- 2) недостатня кількість (або повна відсутність) промислових досліджень і технологічних розробок;
- 3) недостатня кількість (або повна відсутність) стратегій виробництва;
- 4) погано сплановане перенесення технології та неприйнятний розподіл відповідальності між розробниками.

Оптимізувати поетапну розробку можна фокусуванням на виробництві інтересів усіх залучених груп. Оскільки єдина причина початку розробки будь-якого продукту, у тому числі лікарського препарату, полягає в тому, щоб комерціалізувати його в майбутньому, то зусилля з розробки в ідеалі мають бути направлені на забезпечення комерційного виробництва від початку досліджень до реєстрації й затвердження виробничого процесу.

Синхронна розробка має багато інших найменувань, наприклад паралельна розробка, конкурентний або супутній інжиніринг. Існує кілька способів узгодження інтересів усіх залучених груп.

Прямий контакт є найпростішим і найлегшим способом. Взаємодія між групами розробки відбувається без формального організаційного засобу керування у формі спланованих семінарів і оглядових конференцій.

Співрозміщення – територіальне об'єднання групи розробників, пілотної лінії та великомасштабного виробництва з необмеженим контактом між ними.

Зв'язковий – зворотній зв'язок забезпечено призначенням помічника зі зв'язків між групами.

Команда проекту. Проектна команда – делеговані обізнані члени від кожної групи. Вони мають перехресні функції та зазвичай працюють над окремим проектом доти, доки не закінчать його.

Вторинний контакт, або відрядження – переміщення співробітника з одного відділу в інший на визначений термін, тобто фактичне включення фахівця в роботу то однієї, то іншої групи. Цей спосіб можна використовувати з метою перенесення експертних оцінок, ідей від однієї групи до іншої.

Матриця. За матричного керування люди, що працюють над розробкою проекту, регулярно доповідають у своїх відділах про розв'язання технічних питань, а про хід робіт із проекту – безпосередньо його керівнику.

Вибір найкращого способу чи комбінації способів для синхронної розробки визначено типом і масштабом проекту. Проте існує лише один спосіб об'єднати активність розробників – *ефективне керування пілотним заводом* як центральною ланкою організації біотехнологічного процесу. Пріоритети розробки та виробництва часто протилежні й не перетинаються. В унікальному положенні ланки, що об'єднує всіх, пілотний завод може погоджувати різні вимоги дослідників і виробників.

Потенційна проблема такого підходу – розподіл контролю, відповідальності й повноважень в організації. Оскільки консенсус можливий не завжди, то хтось один має взяти на себе повноваження приймати рішення та домагатися їх виконання. Ідеально, якщо це буде керівник пілотного заводу, проміжної ланки, у якій поєднано інтереси й потреби як розробників, так і виробників.

Кругова організація. З моменту перенесення розробки на пілотний завод стає можливим організацію процесу зробити круговою (рис. 3.2).



Рис. 3.2. Схема організації стандартного пілотного заводу

Така форма організації значно пришвидшує та знижує вартість упровадження розробки, оскільки масштабування, виробництво кінцевого продукту, маркетинг і валідацію можна виконувати одночасно.

Отже, біотехнологічний процес є складним поєднанням експериментальної, експериментально-виробничої, виробничої, юридичної та економічної роботи. Критичним для кінцевого успіху розробки технології є узгодження взаємодії всіх ланок процесу, що й зумовлює визначальну роль пілотного заводу в успішності інновації. Територіальне розміщення груп розробки великомасштабного виробництва, підпорядкування пілотного заводу не відіграє значної ролі, хоча тісніший контакт із розробниками бажаний. В Україні оптимальним є створення пілотних заводів на базі науково-дослідних інститутів і біологічних факультетів ЗВО.

Запитання для самоконтролю

1. Перерахуйте етапи розробки біотехнологічного процесу.
2. Які критерії необхідно враховувати при розробці етапу upstream?
3. Які критерії треба контролювати на етапі downstream?
4. Яких вимог слід дотримуватись при передачі технологій на виробництво?
5. Чому не можна просто пропорційно збільшити всі лабораторні процеси під час масштабування?
6. Хто зазвичай фінансує лабораторне дослідження/розробку біотехнологічного процесу?
7. Наведіть загальний план усіх етапів розробки й упровадження біотехнологічного виробництва.
8. Що таке масштабування?
9. Охарактеризуйте завдання, які має розв'язувати пілотний завод.
10. Які вимоги до організації пілотного заводу?
11. Охарактеризуйте часові інтервали для вимірів ефективності ферментації різними продуцентами, а також для фільтрації та центрифугування.
12. Що таке стандартні операційні процедури? Наведіть приклади.
13. Поясніть основні вимоги до ведення документації при валідації біотехнологічних виробництв.
14. Наведіть недоліки поетапної розробки процесу біотехнологічного виробництва.
15. Які способи співпраці й узгодження між залученими групами при синхронній розробці процесу біотехнологічного виробництва?
16. Поясніть суть кругової організації розробки процесу біотехнологічного виробництва.

Глава 4

СИСТЕМА СТАНДАРТИЗАЦІЇ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ВИРОБНИЦТВ

4.1. Система стандартизації виробництв і контролю якості на прикладі лікарських засобів

У сучасних умовах ринок лікарських засобів є в повному розумінні слова міжнародним. Ліки можуть вироблятися на одному континенті, а споживатися на іншому. Споживач відділений від виробника тисячами кілометрів. Систематично зростає різноманіття як ліків, так і лікарських форм, а також конкуренція між їх виробниками. Лікарські засоби виробляються в країнах із різним соціальним устроєм, відмінностями в національних традиціях і звичаях.

Лікарські засоби належать до виду продукції, оцінити якість, ефективність і безпеку якої споживачі не завжди можуть, оскільки для цього потрібні спеціалізовані лабораторії. Загальновідомо, що якість лікарського засобу гарантує фармакопея, що має законодавчий характер.

Однак уже із середини ХХ ст. з'явилася необхідність ще в одному документі. Цей документ, точніше збірник документів, – GMP, Good Manufacturing Practice – "Належна виробнича практика" (лікарських засобів) – не замінює фармакопеї, а доповнює її, служить одній кінцевій меті – гарантувати споживачеві високу якість лікарських засобів. Якщо фармакопея належить безпосередньо до лікарського засобу, то офіційна назва цього документа в перекладі – "Правила організації

виробництва та контролю якості лікарських засобів" – до підприємства, на якому виробляються ліки.

Правила GMP – вимоги до регламенту виробництва лікарських засобів, що забезпечують високу культуру роботи на підприємстві щодо всіх лікарських препаратів, які випускаються, – мають офіційний характер і складаються з переліку нормативних документів. Вони обов'язкові для всіх підприємств, що випускають як готові лікарські засоби, так і субстанції – біологічно активні речовини, призначені для виготовлення готових лікарських засобів. Недотримання зазначених правил призводить до накладання санкцій і закриття виробництва.

Уперше правила GMP були прийняті в 1963 р. у США. Однак реальної міжнародної значущості вони набули у 1969 р., коли під егідою ВООЗ близько ста держав світу уклали багатосторонню угоду, прийнявши документ, що називається *"Система засвідчення якості фармацевтичних препаратів у міжнародній торгівлі"*. Підкреслювалося, що новий документ уводиться для надання допомоги органам охорони здоров'я країн, які імпортують, в оцінюванні технічного рівня виробництва та якості закупаваних ними лікарських засобів.

Прийняття такого документа означало, що фармакопея як єдиний контролюючий елемент, який гарантує ефективність і безпеку ліків, стала недостатньо ефективною. Тому виникла потреба посилення контролю фармацевтичної продукції. Укладена угода надавала певні права також експортерам лікарських засобів, що прагнули розширити ринок збуту продукції. Однак експортерам, щоб скористатися цими правами, необхідно дотримуватися трьох умов:

- 1) реєстрація лікарських засобів у країні, де виробляється продукція;
- 2) державне інспектування фармацевтичних підприємств;
- 3) правила GMP мають бути офіційно прийняті.

Надалі, з 1975 р., цей документ неодноразово вдосконалювався. На сьогодні окрім міжнародних правил GMP, прийнятих ВООЗ, існують національні правила GMP, прийняті більш ніж у 30 країнах (США, Великобританії, Японії та ін.), і

регіональні, наприклад правила GMP Європейського співтовариства, Асоціації країн Південно-Східної Азії, Арабського союзу виробників фармпрепаратів тощо.

З різних причин ці документи трохи відрізняються, зокрема через спроби полегшити реалізацію продукції на внутрішньому ринку (іноді тимчасово) для того, щоб одержати можливість надалі вийти на міжнародний ринок.

Правила GMP у їх сучасному вигляді мають подібну рубрикацію незалежно від того, чи є вони національними, регіональними чи міжнародними, і складаються із восьми розділів.

У першому розділі – "*Термінологія*" – надаються означення ключових понять, що використовуються в документі. Щоб уникнути зайвих дискусій, їх уточнення необхідне у випадку виникнення конфліктних ситуацій. Починається розділ з означення фармацевтичного виробництва, потім ідуть означення таких понять, як процеси виробництва, заходи, матеріали, приміщення тощо.

У другому розділі – "*Забезпечення якості*" – зазначені обов'язкові заходи, що включають укомплектованість персоналом і наявність співробітників, відповідальних за якість продукції; реєстрацію етапів виробництва; визначається порядок повернення серій продукції при порушенні її якості; з'ясування причин порушень якості тощо.

Третій розділ (з кількома підрозділами) стосується персоналу фармацевтичного підприємства. У ньому підкреслюється обов'язковість профільної освіти для керівника фармацевтичного підприємства (але не власника), чіткого розмежування функцій керівників. Спеціально обговорюються порядок підготовки персоналу, особиста гігієна та поведінка персоналу, особливо в "чистих" приміщеннях. Перераховуються правила користування і підтримки у функціональному стані технологічного одягу. Нарешті, перераховуються інструкції для персоналу, порядок доведення їх до відома працівників тощо.

Як приклад підвищеної уваги до персоналу фармацевтичних підприємств можна зазначити, що в деяких національних правилах GMP пропонується навіть попереднє тестування та

відбір працівників "чистих" приміщень за стереотипом: у деяких випадках перевага віддається флегматикам, які "роблять менше зайвих рухів", але разом з тим сангвінікам і холерикам ніхто не перешкоджає бути власниками підприємств, комерційними директорами тощо.

Ще один приклад – увага до гігієни персоналу. У деяких національних правилах GMP існують рекомендації щодо часу прийняття душу – лише після роботи, оскільки після гарячої води можливе лущення шкіри, що протипоказано для роботи в "чистих" приміщеннях.

Четвертий розділ правил GMP стосується відповідності до фармацевтичного виробництва будівель і приміщень. У ньому міститься понад сорок вимог, хоча таку вимогу як обов'язкове розташування фармацевтичного підприємства поза житловими зонами й на значній відстані від інших виробництв, які негативно впливають (унаслідок забруднення атмосфери тощо) на якість фармацевтичної продукції, виконати надзвичайно важко.

Правила GMP стосовно саме біотехнологічного виробництва полягають у такому. При роботі з продуцентами-рекомбінантами дотримуються запобіжних заходів, передбачених спеціальними інструкціями. Це стосується, зокрема, систем вентиляції приміщень, їх ізоляції тощо.

Особливих вимог до біотехнологічного виробництва слід дотримуватися в промисловому синтезі антибіотиків. З огляду на алергійність β -лактамних структур виробничі процеси, пов'язані з виробництвом пеніциліну і його похідних, рекомендується проводити в окремих приміщеннях. Пеніцилін порівняно з багатьма іншими антибіотиками малотоксичний, проте його алергійність, як відомо, виявляється за дуже малих концентрацій, тому навіть слідові кількості пеніциліну при потраплянні в препарати інших антибіотиків і взагалі в іншу продукцію можуть викликати небажані наслідки. Отже, для роботи з пеніциліном рекомендується використовувати окремі емності, трубопроводи тощо.

П'ятий розділ правил GMP пов'язаний з технологічним обладнанням, починаючи з цехів ферментації, хімічного очищення тощо. Обладнання має бути адекватним процесам,

контрольно-вимірювальні прилади відповідно до графіка мають регулярно перевірятися. Низка рекомендацій стосується конструкцій обладнання, його розміщення та експлуатації. Зокрема, звертається увага на те, щоб поверхні обладнання, які контактують із сировиною, проміжними й кінцевими продуктами, з ними не взаємодіяли, витримували контакт із дезінфікуючими розчинами тощо.

Шостий розділ правил GMP стосується процесу виробництва загалом. Значна увага тут приділяється характеристикам вихідної сировини (документації, умовам зберігання, контролю тощо). Для біотехнологічного виробництва особливе значення мають такі види сировини, як компоненти комплексних живильних середовищ: кукурудзяний екстракт, бавовняне, горохове борошно та ін. Відповідно до вимог GMP сировина такого типу піддається перевірці на мікробну контамінацію та зберігається в окремих приміщеннях – не виробничих і не підвальних (тобто не у вологих умовах). Видача серій (зразків) сировини для використання у виробничому процесі реєструється. Усе це особливо важливо для біотехнологічного виробництва, урахувавши труднощі стандартизації комплексних живильних середовищ.

У цей розділ входить також найважливіший пункт, у якому зазначено, що на підприємстві обов'язковим є постадійний контроль процесу виробництва, який здійснюється спільно працівниками цехів і відділу технічного контролю. При цьому перевіряються відповідність сировини, допоміжних матеріалів і напівпродуктів до вимог нормативно-технічної документації, санітарний стан цехів і робочих місць, виконання регламентованих технологічних операцій. Результати постадійного контролю постійно фіксуються. Записи результатів перевірки зберігаються не менше року після закінчення терміну придатності лікарського засобу, при виготовленні якого була проведена перевірка. Таким чином, робота підприємства, якщо вона ведеться відповідно до правил GMP, дозволяє мати всі необхідні документи для виявлення причин надзвичайних ситуацій, навіть якщо вони відбулися давно.

Сьомий розділ правил GMP присвячений відділу технічного контролю (ВТК). Зазначається, що такий відділ є обов'язковим для фармацевтичного підприємства. Цей відділ контролює не лише готовий продукт, а й сировину і напівпродукти при їх передачі з цеху в цех. Саме ВТК контролює стабільність готового продукту, зберігає зразки кожної його серії (не менше трьох років).

Восьмий розділ правил GMP має особливе значення й називається "*Валідація*". Розгорнутий зміст назви такий: оцінювання і документоване підтвердження відповідності виробничого процесу і якості продукту до встановлених вимог.

Правила GMP починають поступово поширюватися практично на всі сфери діяльності фармацевтичного підприємства і продовжують постійно вдосконалюватися. Нещодавно, крім зазначених, з'явилися розділи "*Відходи*", "*Робота за контрактом*", "*Рекламація і відкликання продукту*", "*Підвищення культури роботи підприємства*", "*Конкурентоспроможність*".

Нині правила GMP прийняті більше ніж у 140 країнах світу.

Правила GLP, *Good Laboratory Practice* – "Правильно (належним чином) організовані лабораторні випробування" (точніший переклад – не лабораторні, а *доклінічні випробування нового препарату*) – потребують не лише точного дотримання набору тестів, але й максимально можливої стандартизації умов при тестуванні лікарських засобів. Відтворюваність результатів при роботі з лабораторними тваринами має бути зумовлена дотриманням багатьох вимог, пов'язаних, наприклад, з підбором лінійних тварин, утриманням їх на стандартній дієті тощо. Крім того, тварини у віварії мають бути розміщені таким чином, щоб дія стресових чинників зводилася до мінімуму (щоб уникнути спотворення результатів випробувань).

Нові, цілеспрямовано або випадково відкриті речовини за спектром біологічної активності можуть вивчатися в будь-яких напрямках. Однак для проведення доклінічних випробувань цих речовин і на добровольцях у клініці (з подальшим упровадженням у медичну практику) необхідне обов'язкове

дотримання правил GLP. Це дозволяє гарантувати максимальну безпеку нової речовини при її подальшому введенні людям.

Нові лікарські засоби можуть володіти видоспецифічністю і, незважаючи на позитивні результати випробувань на тваринах, при клінічних випробуваннях на людях-добровольцях – призвести до негативного результату.

Сьогодні є спроби замінити експерименти на тваринах (ссавцях) біохімічними й біофізичними тестами з використанням ферментних систем, тканин і органів безхребетних. Подібні спроби передусім спрямовані на гуманізацію експериментів.

Загалом правила GLP – це великий пакет документів, їх розробка й удосконалення в різних напрямках тривають.

Абревіатура *GCP* розшифровується як *Good Clinical Practice* і означає "Правильна (належна) організація клінічних випробувань" (нового лікарського препарату). Після завершення доклінічних випробувань нової біологічно активної речовини з позитивним результатом відповідні офіційні інстанції видають дозвіл на її випробування в клініці.

Щодо правил *GCP* необхідно підкреслити два основні аспекти – дотримання максимальної безпеки й досягнення максимальної вірогідності результатів, одержаних на пацієнтах-добровольцях. Важливо, щоб люди, яким уводиться новий препарат, були проінформовані про нього і дали згоду на апробацію. Також вони мають одержати додаткову інформацію, у тому числі про право на відшкодування збитків у надзвичайних ситуаціях. За винятком спеціально обумовлених ситуацій випробування нових препаратів на дітях заборонені.

Останніми роками за кордоном упроваджується нова форма захисту прав пацієнтів. Організуються етичні (суспільні) комітети, що не залежать від адміністрації лікувальних установ, у яких проводяться випробування. До складу цих комітетів входять медики, юристи, священнослужителі, представники влади тощо. Їхні функції обмежуються контролем за дотриманням прав пацієнтів-добровольців, на яких проводяться випробування нових препаратів (відповідно до правил *GCP*). Рекомендацій щодо схем і режимів лікування етичні комітети не дають.

Питання про достовірність результатів клінічних випробувань є досить складним. Одна з проблем – виключення впливу особистої зацікавленості тих, хто випробовує препарат. Причини такої зацікавленості можуть бути різні, наприклад "тиск" з боку розробників, фірм-власників препаратів тощо.

Одним зі шляхів підвищення достовірності результатів клінічних випробувань є об'єднання матеріалів, які одержують колективи незалежних дослідників. Дані, отримані, наприклад, у п'яти клініках (по сто випадків застосування в кожній), дозволяють зробити достовірніші висновки про ефективність і безпеку препарату, ніж матеріали, одержані з тією самою кількістю хворих, але в одній установі. Зрозуміло, це лише один із прикладів проведення клінічних випробувань відповідно до правил GCP.

Загалом проведення клінічних випробувань фармацевтичних препаратів регламентується значною кількістю взаємопов'язаних документів. Дослідження, випробування та виробництво фармацевтичних препаратів жорстко регламентуються, і нові препарати проходять усі зазначені стадії, перебуваючи безпосередньо під контролем спочатку правил GLP, потім GCP і, нарешті, GMP.

Запитання для самоконтролю

1. Що таке GMP?
2. Наведіть правила, яких повинні дотримуватись виробники, що прагнуть експортувати свою продукцію.
3. Скільки розділів мають зазвичай правила GMP? Наведіть приклади розділів.
4. У чому полягають правила GMP стосовно саме біотехнологічного виробництва?
5. Яка поширеність GMP, скільки країн світу ними керуються?
6. Поясніть, чим GLP відрізняється від GMP.
7. Відповідно до правил GCP краще провести тестування препарату на 100 піддослідних в одній установі чи на такій самій кількості волонтерів, але в різних установах? Відповідь поясніть.
8. Поясніть послідовність стадій GLP – GCP – GMP для впровадження нових лікарських засобів.

4.2. Кваліфікація і валідація

Валідація (validation) – це:

- надбання законної сили, затвердження, легалізація, ратифікація (загальногромадянське право);
- процес, що дозволяє визначити, наскільки точно з позицій потенційного користувача певна модель відтворює задані характеристики реального світу (системне програмування);
- процедура, що дає високий ступінь упевненості в тому, що конкретний процес, метод або система буде послідовно приводити до результатів, які відповідають заздалегідь установленим критеріям прийнятності; зокрема, валідація технологічних процесів проводиться з використанням зразків не менше трьох серій реального продукту з метою доказу і надання документального свідчення, що процес (у межах установлених параметрів) має повторюваність і гарантує очікувані результати при виробництві напівпродукту або готового продукту необхідної якості; валідація аналітичних методів полягає у визначенні точності, відтворюваності, чутливості, стійкості (міжлабораторна відтворюваність), лінійності та інших метрологічних характеристик.

Валідація дозволяє одержати дані про відповідність технологічного процесу до регламенту, а якості готового продукту – до нормативно-технічної документації. Оцінюються процес, устаткування (його адекватність поставленому завданню), нарешті, кінцевий продукт, межі можливих відхилень у веденні процесу. Валідація завершується складанням звіту, на підставі якого технологічний процес або атестується, або ні. Валідація виконується для кожного нового технологічного процесу перед його впровадженням у виробництво як для стерильних, так і для нестерильних лікарських засобів.

Повторна валідація проводиться за графіком, ревалідація – за часткової зміни технології вже існуючого процесу (заміна сировини, устаткування тощо). Біотехнологічне виробництво має щодо цього свою специфіку, яка відрізняє його від хіміко-

технологічного виробництва. Наприклад, на біотехнологічному підприємстві може відбуватися заміна штаму продуцента. Нерідко це дочірній штам, отриманий генетиками зі штаму, раніше використовуваного підприємством, але здатний синтезувати більше цільового продукту, тобто рентабельніший.

Виникає питання: чи треба при цьому проводити валідацію, що вимагає певної витрати сил, часу й засобів? Відповідь однозначна: валідація обов'язкова. Вища активність нового продуцента означає наявність змін у його метаболізмі. Ці зміни можуть призводити не тільки до більшої продуктивності, але й до зрушень у наборі й концентрації низки його метаболітів. Схема виділення й очищення цільового продукту, прийнята відповідно до регламенту на підприємстві, може в нових умовах виявитися незадовільною, тому і процес, і кінцевий продукт вимагають валідації. Те саме у випадках, коли на підприємстві замінюють ферментаційне середовище більш продуктивним (або з менш дефіцитними компонентами) – можлива зміна метаболізму продуцента обов'язково вимагає валідації.

Використовуються терміни: *перспективна валідація* – перед упровадженням технологічного процесу у виробництво; *ретроспективна валідація* – аналіз даних, отриманих за певний час із відповідними висновками.

При валідації допускається експеримент – моделювання умов, у яких проводиться технологічний процес, з наближенням до екстремальних, наприклад підвищення температури в приміщеннях (звичайно в певних межах) тощо. Це дозволяє з'ясувати границі відхилень, у межах яких даний технологічний процес не буде змінюватись, впливаючи на якість цільового продукту. Іноді такі експерименти супроводжуються частішим добором проб для ефективнішого контролю порівняно з регламентними вимогами.

Планування валідації. Усю діяльність щодо валідації слід планувати. Ключові елементи програми валідації слід чітко визначити й задокументувати в основному плані валідації (*validation master plan – VMP*) або відповідних документах.

Основний план валідації має бути узагальнюючим документом, лаконічним, точним і чітким та містити щонайменше таку інформацію:

- політика валідації;
- організація діяльності для забезпечення валідації;
- короткий опис технічних засобів, систем, обладнання та процесів, що підлягають валідації;
- форма документації; форма, яку слід використовувати для протоколів і звітів;
- планування та складання графіка валідації;
- контроль змін;
- посилання на існуючі документи.

У разі великих проектів може виникнути необхідність складання окремих основних планів валідації.

Документація. Слід розробити письмовий протокол зі вказівками, яким чином будуть здійснюватися кваліфікація й валідація. Такий протокол має бути перевірений і затверджений. У протоколі мають бути зазначені критичні етапи та критерії прийнятності. Має бути підготовлений звіт з перехресними посиланнями на протокол кваліфікації та/або валідації, що узагальнює отримані результати й містить коментарі щодо будь-яких помічених відхилень і висновки, включаючи рекомендовані зміни, необхідні для виправлення недоліків. Будь-які зміни, унесені до плану, наведеного в протоколі, слід документувати з відповідним обґрунтуванням. Після завершення кваліфікації із задовільними результатами слід оформити офіційний письмовий дозвіл для переходу до наступної стадії кваліфікації та валідації.

Кваліфікація. Першим елементом валідації нових технічних засобів, систем або обладнання може бути кваліфікація проекту (*Design Qualification – DQ*). Слід довести й задокументувати відповідність проекту до вимог GMP. Кваліфікацію монтажу (*Installation Qualification – IQ*) слід проводити для нових або модифікованих технічних засобів, систем і обладнання.

Кваліфікація монтажу має включати такі елементи (але не обмежуватися ними):

- перевірку монтажу обладнання, трубопроводів, допоміжних систем і приладів на відповідність до діючих технічних креслень і специфікацій;
- підбирання і зіставлення інструкцій з експлуатації від постачальника обладнання і реальних умов роботи, а також вимог до технічного обслуговування;
- вимоги до калібрування приладів;
- верифікацію матеріалів, використаних у конструкціях.

Кваліфікація функціонування (*Operational Qualification – OQ*) має відбуватися після кваліфікації монтажу. Кваліфікація функціонування включає такі елементи (але не обмежується ними):

- випробування, розроблені на підставі знань про етапи процесу, систем загалом та обладнання;
- випробування, що включають умову чи низку умов, що охоплюють верхню й нижню межі робочих параметрів, які іноді відносять до умов "найгіршого випадку".

Успішне завершення кваліфікації функціонування має сприяти остаточному оформленню методик калібрування, проведення робіт і очищення, навчання операторів, а також вимог до профілактичного технічного обслуговування. Це дозволить офіційно завершити випуск технічних засобів, систем і обладнання. Кваліфікація експлуатаційних властивостей (*Performance Qualification – PQ*) має відбуватися після успішного завершення кваліфікацій монтажу та функціонування. Кваліфікація експлуатаційних властивостей має включати такі елементи (але не обмежуватися ними):

- випробування з використанням матеріалів, що застосовують у виробництві, замінників з аналогічними властивостями або моделюючого препарату, розроблені на підставі знань про процес, а також про технічні засоби, системи чи обладнання;
- випробування, що включають умову або низку умов, які охоплюють верхню й нижню межі робочих параметрів.

Хоча кваліфікація експлуатаційних властивостей (PQ) описана як окремий вид діяльності, у деяких випадках доцільно проводити її разом із кваліфікацією функціонування (OQ). Необхідно мати дані, які обґрунтовують і підтверджують робочі параметри й межі для критичних змінних параметрів обладнання, що експлуатується. Крім того, слід задокументувати процедури з калібрування, очищення, профілактичного технічного обслуговування й експлуатації, навчання операторів, а також вести протоколи з цих видів діяльності.

Валідація процесу зазвичай має бути завершена до дистрибуції та продажу лікарського препарату (*перспективна валідація*). У виняткових випадках, коли така валідація неможлива, доцільно валідувати процеси під час серійного виробництва (*супутня валідація*). Процеси, які вже відбувалися протягом деякого часу, також підлягають валідації (*ретроспективна валідація*). Технічні засоби, системи й обладнання, що використовуються, мають бути кваліфіковані, а аналітичні методи випробувань – валідовані. Персонал, що бере участь у роботі з валідації, повинен бути відповідним чином навчений. Слід проводити періодичне оцінювання технічних засобів, систем, обладнання і процесів для підтвердження того, що вони продовжують функціонувати затвердженим чином.

Перспективна валідація. Перспективна валідація має включати такі елементи (але не обмежуватися ними):

- короткий опис процесу;
- коротке зведення критичних етапів процесу, що підлягають дослідженню;
- перелік обладнання / технічних засобів, що використовуються (включаючи вимірювальне / контролююче / реєструюче обладнання), а також статус їхнього калібрування;
- специфікації на готову продукцію при випуску;
- перелік аналітичних методів, якщо необхідно;
- пропонувані точки контролю в процесі виробництва та критерії їх прийнятності;

- за необхідності додаткові випробування, які слід провести, разом із критеріями прийнятності й аналітичною валідацією;
- план відбору проб;
- методи реєстрації й оцінювання результатів;
- функції та обов'язки відповідного персоналу;
- запропонований часовий графік проведення повторної перевірки.

За допомогою встановленого процесу (використовуючи компоненти, що відповідають специфікаціям) можна виготовити ряд серій готової продукції за рутинних умов. Теоретично кількість виконаних виробничих циклів і зроблених спостережень має бути достатньою, щоб дозволити встановити звичайну міру варіації й тенденції, а також забезпечити необхідну кількість даних для оцінювання. Звичайно допускається, що для належної валідації процесу достатньо трьох послідовних серій/циклів у межах остаточно узгоджених параметрів. Серії, виготовлені для валідації процесу, мають бути такого самого розміру, що й серії, які плануються для промислового виробництва. Якщо передбачається продаж чи постачання серій, виготовлених при валідації, то умови, за яких вони виготовлені, мають цілком відповідати реєстраційному досьє та вимогам належної виробничої практики, включаючи задовільний результат валідації.

Супутня валідація. У виняткових випадках допускається не завершувати програму валідації до початку серійного виробництва. Рішення щодо проведення супутньої валідації має бути обґрунтоване, задокументоване й затверджене вповноваженим персоналом. Вимоги до документації для супутньої валідації є такими самими, як і вимоги, установлені для перспективної валідації.

Ретроспективна валідація. Ретроспективна валідація застосовується лише для добре відпрацьованих процесів і є неприйнятною, якщо нещодавно було внесено зміни до складу препарату, робочих методик або обладнання. Валідація таких процесів має засновуватися на ретроспективних даних. Необхідним етапом є складання спеціального протоколу та

звіту з результатів огляду даних із подальшою видачею висновку й рекомендацій. Джерела даних для такої валідації мають включати (але не обмежуватися ними): протоколи обробки та пакування серії, діаграми контролю за процесом, журнали технічного обслуговування, протоколи заміни персоналу, дослідження можливостей стійкості процесу, дані про готову продукцію, у тому числі таблиці, що відображають тенденції, а також результати вивчення стабільності при зберіганні. Серії, обрані для ретроспективної валідації, мають бути репрезентативними для всіх серій, виготовлених протягом періоду, що перевіряється, включаючи всі серії, що не відповідають специфікаціям; їхня кількість має бути достатньою для доказу постійності процесу. Щоб ретроспективно затвердити процес, можуть знадобитися додаткові випробування архівних зразків для отримання необхідної кількості або необхідного виду даних. При ретроспективній валідації для оцінювання постійності процесу зазвичай слід вивчити дані для 10–30 послідовних серій, проте за наявності відповідного обґрунтування кількість досліджуваних серій може бути зменшена.

Валідація очищення. Валідацію етапу очищення слід проводити для того, щоб підтвердити його ефективність. Вибрані межі для залишків препарату, що переносяться, миючих засобів, а також мікробної контамінації мають логічно ґрунтуватися на властивостях матеріалів, які застосовуються. Межі мають бути такими, щоб їх можна було досягти й перевірити. Для виявлення залишків або забруднювальних речовин слід використовувати валідовані аналітичні методи. Межа виявлення для кожного аналітичного методу має бути достатньою для того, щоб визначити встановлений допустимий рівень залишку або забруднювальної речовини. Зазвичай необхідно проводити валідацію лише процедур очищення поверхонь обладнання, що контактують із продукцією. Проте слід приділяти увагу й ділянкам, що не контактують із продукцією. Відрізки часу між використанням і очищенням, а також між очищенням і повторним використанням обладнання

мають бути валідовані. Необхідно визначити час і способи очищення. Для процедур очищення, пов'язаних із дуже схожими препаратами та процесами, вважається допустимим вибрати репрезентативний ряд схожих препаратів і процесів. У таких випадках можна провести одне валідаційне дослідження з використанням підходу "найгірший випадок", за якого враховані всі критичні точки. Для доказу того, що спосіб валідований, зазвичай слід тричі послідовно виконати процедуру очищення і показати, що всі спроби виявилися успішними. Практика "випробовувати доти, доки не буде чисто" не вважається альтернативою валідації очищення. Якщо речовини, що видаляються, токсичні чи небезпечні, то, як виняток, замість них можна використати продукти, що моделюють фізико-хімічні властивості таких речовин.

Контроль змін. Необхідно мати письмові методики з описом дій, яких слід уживати, якщо передбачаються зміни вихідної сировини, компонентів препарату, технологічного обладнання, умов навколишнього середовища (або ділянки), способу виробництва або методу випробувань чи будь-яких інших критеріїв, що можуть вплинути на якість продукції або відтворюваність процесу. Процедури контролю змін мають забезпечити достатню кількість даних для підтвердження того, що змінений процес дозволяє отримувати продукцію бажаної якості, яка відповідає затвердженним специфікаціям. Усі зміни, які можуть вплинути на якість продукції чи відтворюваність процесу, мають бути задокументовані й затверджені. Потрібно оцінити можливий вплив зміни технічних засобів, систем і обладнання на продукцію, у тому числі провести аналіз ризиків. Слід визначити необхідність і обсяг рекваліфікації та ревалідації.

Ревалідація. Необхідно проводити періодичне оцінювання технічних засобів, систем, обладнання та процесів, включаючи очищення, для підтвердження, що вони залишаються в тому стані, який був валідований. Якщо в технічні засоби, системи, обладнання та процеси не було внесено значних змін, то для

ревалідації треба провести перевірку, що доводить їхню відповідність до встановлених вимог.

Запитання для самоконтролю

1. Що таке валідація в контексті біотехнологічного виробництва?
2. Поясніть, навіщо при валідації допускається експеримент – моделювання умов, у яких проводиться технологічний процес, з наближенням до екстремальних, наприклад підвищення температури в приміщеннях (звичайно в певних межах) тощо.
3. Що таке кваліфікація і чого вона може стосуватися?
4. Наведіть типи валідації за часом її проведення.
5. Поясніть, що таке валідація очищення та контроль змін.

4.3. Стандартні операційні процедури (СОП)

Одним з найважливіших аспектів забезпечення якості є дотримання *стандартних робочих процедур (СОП)* під час виробництва. Вищезазначені процедури, зокрема, є документами біотехнологічних підприємств і містять поетапні інструкції, яких неухильно має дотримуватися персонал організації. Фактично весь біотехнологічний процес від сировини до отримання торгової форми цільового біотехнологічного продукту має описуватися безперервною серією СОП. Термін *СОП* має таке означення: *стандартна операційна процедура – це формалізовані алгоритми виконання операцій/дій, дотримання вимог нормативних документів виробництва продукції / надання послуг у певній організації. На меті СОП має правильне і однотипне виконання певної операції завжди однаковим чином. СОП повинні бути легкодоступні в місці, де описані в них процедури виконуються.*

Стандартні операційні процедури є обов'язковими інструкціями. У випадку, коли відхилення від них дозволені, умови для цього мають бути задокументовані, а також надано перелік осіб, уповноважених на надання дозволу, і пояснення, у чому саме полягає повна процедура. Оригінали зберігаються в

надійному місці, а робочі копії, завірені печаткою та/або підписом уповноважених осіб, – безпосередньо біля місць їх застосування. На підприємстві має бути по одній СОП на кожну процедуру, що виконується.

СОП, які задокументовано, забезпечують таке.

Узгодженість. Усі співробітники повинні виконувати процедуру однаково, щоб був отриманий той самий результат, хто б не виконував процедуру.

Правильність. За умови, що всі співробітники керуються задокументованими процедурами, не пропускаючи жодного етапу, отримуватиметься правильний і відтворюваний результат, на противагу ситуації, коли кожен буде покладатися на власну пам'ять і вибіркові/неповні записи.

Якість. Узгоджені (відтворювані, стандартизовані) і правильні результати роботи підприємства належать до головних цілей біотехнологічної діяльності й можуть розглядатися як визначення якості роботи загалом.

Мета написання стандартних операційних процедур полягає в детальному описі заходів, які проводяться на підприємстві для того, щоб:

- забезпечити одноманітність, узгодженість і надійність будь-якого виду діяльності, що виконується підприємством/лабораторією;
- знизити ймовірність систематичних похибок;
- організувати професійне навчання та інструктаж нових співробітників.

СОПи мають розроблятися спеціально підготовленим технічним персоналом з оперативних підрозділів, а їх рецензуванням і остаточним затвердженням повинні займатися безпосередні керівники підрозділів і директор установи. Необхідно визначити й зареєструвати особу, відповідальну за належне поширення документів, подачу й адміністрування їх оригіналів і копій тощо. Слід також обов'язково зазначити, як часто діюча СОП переглядатиметься й оцінюватиметься (у середньому кожні два роки) і ким. Дозволено використовувати

винятково офіційно випущені копії, лише за таких умов гарантований належний інструктаж.

Стандартні операційні процедури слід розробляти для всіх процедур, зокрема:

- *Загальні аспекти:* оформлення СОПів, виправлення робочих записів і документації, підготовка протоколів, звітних матеріалів.
- *Системи тестування:* підготовка виробничих ділянок до роботи й забезпечення їх експлуатаційної відповідності, методи взяття проб.
- *Лабораторні методи:* забір проб, ідентифікація, маркування, мийка, стерилізація матеріалів, зберігання зразків, маркування проб, реактивів, розчинів.
- *Аспекти, пов'язані з персоналом:* професійна підготовка, порядок поводження з небезпечними хімічними речовинами, техніка безпеки на виробництві й у лабораторії, укомплектування персоналом кожного структурного підрозділу.
- *Еталонні матеріали:* ідентифікація, визначення характеристик, порядок використання, отримання, зберігання, застосування.
- *Архів:* ведення документації, розподіл і оновлення.
- *Обладнання:* калібрування, регламентні роботи. Для опису порядку використання й організації роботи обладнання служать відповідні інструкції, а не стандартні операційні процедури.
- *Методи:* для обробки, аналізу різних проб у лабораторії; методи, що становлять технологічні основи біотехнологічних процесів на підприємстві.

Під час формулювання стандартних операційних процедур використовуюється такий формат:

Назва: описова;

Код: за ним можна визначити:

- структурний підрозділ;
- число, що визначає кожну процедуру;

- число, відповідне до конкретного перегляду документації, причому для позначення першого документа прийнято застосовувати 00.

Мета: мета процедури, яка підлягає опису, має бути сформульована чітко й коротко.

Сфера застосування: оперативний підрозділ, що буде користуватися процедурою, і область її застосування на практиці.

Визначення: має бути сформульоване значення основної термінології, яка використовується при описі конкретної процедури.

Загальний опис: необхідно з усією точністю та ясністю, без будь-якої двозначності характеризувати кожен стандартну операційну процедуру, щоб її могли легко зрозуміти не лише фахівці, а й співробітники без досвіду. Кожен етап у процесі виконання виду діяльності, який регулюється відповідно до прийнятої процедури, підлягає детальному викладенню. На доданок до описової частини можуть використовуватись схеми послідовності операцій.

Умови техніки безпеки: вони мають відображати міри й умови безпеки, якими слід керуватися для правильного дотримання СОП. При використанні небезпечних хімічних речовин у комплект необхідної документації входять *Формуляри з безпеки матеріалів*.

Документація: реєстраційна форма чи протокол, куди заносять дані й результати вимірювань, отримані при виконанні процедур.

Довідкові матеріали й документи: довідкові матеріали, на основі яких розробляють СОП.

Будь-яка СОП на кожній сторінці має містити такі відомості:

- символіку і назву організації;
- відділ чи структурний підрозділ, який здійснює оформлення стандартної операційної процедури;
- назву;
- підпис особи, яка є автором СОП, із зазначенням дати (день, місяць, рік);

- підпис особи, що рецензувала документ, із зазначенням дати (день, місяць і рік);
- підпис особи, що затвердила документ, із зазначенням дати (день, місяць і рік);
- термін дії;
- дату перегляду;
- код;
- нумерацію сторінок і загальну їхню кількість у документі.

Якісна СОП має:

- бути детальною, зрозумілою й небагатослівною, щоб персонал, який зазвичай не виконує цю процедуру, міг її виконати, керуючись СОП; містити всю необхідну інформацію, наприклад потрібну температуру інкубації й точні вказівки часу;
- бути зрозумілою для нових співробітників і студентів-практикантів;
- бути розглянута й затверджена керівництвом підрозділу/підприємства; свідоцтвом затвердження є підписи й дати, які важливі для переконання в тому, що для роботи застосовуються правильні процедури, актуальні на даний період;
- регулярно оновлюватись.

Запитання для самоконтролю

1. Що таке СОП?
2. Поясніть, що забезпечує наявність СОП.
3. Які процедури може регламентувати СОП?
4. Наведіть вимоги до якісної стандартної процедури.
5. Поясніть, хто розробляє й затверджує СОП.

Глава 5

БІОКАТАЛІЗ У БІОТЕХНОЛОГІЇ

5.1. Ключові поняття про ферменти як біологічні каталізатори

Одна із основних відмінностей між живим і неживим світом полягає в тому, що сталість неживого ґрунтується на його хімічній незмінності, тоді як стабільність і збереження живого базується на безперервних хімічних змінах, що відбуваються в ньому.

Хімічні процеси в організмі каталізуються особливими речовинами (біокаталізаторами), що називаються *ферментами*, або *ензимами*.

Білкову природу ферментів довів Джеймс Самнер (1926), який отримав перші кристалічні препарати ферменту уреазу.

Установлено, що немає жодного процесу в організмі, який би відбувався без участі ферментів. Розмноження, ріст, травлення, енергозабезпечення, побудова структурних компонентів клітин і тканин, м'язове скорочення, згортання крові пов'язані з роботою ферментів.

Ферментативні процеси людина використовувала ще з глибокої давнини. Протягом тисячоліть люди випікали хліб, виготовляли сир, вина, чай, барвники, дубили шкіри. Однак застосування ферментативних технологій мало тоді суто емпіричний характер. Термін *фермент* уперше був запропонований голландським ученим XVII ст. Ван-Гельмонтом для речовин, що стимулюють перетворення виноградного соку на вино. При цьому відбувається виділення газу, що нагадує кипіння (з лат. *fermentatio* – кипіння, бродіння). Процес назвали ферментацією, а речовини, що його викликають – ферментами. Дещо згодом був запропонований

ще один термін – *ензими* (від грец. *en zyme* – у дріжджах). Обидва терміни вживаються як синоніми.

Учення про ферменти виділилось у самостійну науку – ензимологію, або ферментологію. У 30-х рр. минулого століття ферменти вперше були отримані в кристалічному вигляді. Нині в кристалічному вигляді отримано сотні різних ферментів, розшифровано їхні амінокислотні послідовності, вивчається роль у метаболічних перетвореннях.

Натепер нараховується понад 3000 ферментів, установлена їхня природа, для деяких – і структура, для багатьох – існування різних молекулярних форм – ізоферментів. Усі ферменти мають особливості функціонування, але можна виділити *загальні властивості* для всіх них:

- 1) каталізують лише енергетично можливі реакції;
- 2) прискорюють як пряму, так і зворотну реакцію, але не зміщують напрямку хімічної рівноваги;
- 3) у ході реакції не змінюються й не входять до складу кінцевого продукту;
- 4) мають високу специфічність дії (здатність каталізувати перетворення однієї або групи подібних молекул);
- 5) значно ефективніші, ніж звичайні небіологічні каталізатори – кожна молекула ферменту може виконувати від кількох тисяч до мільйону "обертів" за секунду та прискорювати реакції в мільйони й мільярди разів;
- 6) діють у відносно м'яких умовах (за фізіологічних значень рН, температури, нормального атмосферного тиску);
- 7) є каталізаторами, активність яких може бути регульована, тобто збільшена або зменшена.

Будова ферментів. За хімічною природою ферменти – це переважно білки, що виявляють каталітичні властивості, тобто прискорюють перебіг різних хімічних процесів, які відбуваються в живому організмі. Ферментам притаманні всі фізико-хімічні властивості білків: розщеплення до амінокислот під час гідролізу, висока молекулярна маса, утворення колоїдоподібних розчинів; вони не стійкі до впливу високих температур і солей важких металів, виявляють антигенні властивості, піддаються фракціонуванню.

Ферменти мають велику молекулярну масу і можуть мати три або чотири рівні структурної організації. Молекулярна маса ферментів перебуває в межах від 10 000 до 2 000 000 Да. Ферменти, яким властива четвертинна структура, називають *олігомерними*.

Як і білки, ферменти поділяються на прості та складні. *Прості*, або *однокомпонентні*, ферменти містять у своєму складі тільки амінокислоти, наприклад пепсин, уреазу, РНКазу та ін. Більшість ферментів *двокомпонентні*, тобто складаються з білкової й небілкової частин. Їх називають ще *холоферментами*, а їхні складові – *апофермент* (білкова частина) і *кофактор* (небілкова частина, рис. 5.1).



Рис. 5.1. Схема будови складного (двокомпонентного) ферменту

Таким чином, холофермент – це активний комплекс ферменту, обов'язковою складовою якого є кофактор. Залежно від хімічної природи й міцності зв'язків між білковою та небілковою частинами ферменту можна виділити три групи кофакторів:

1) кофермент – небілкова органічна молекула, яка нековалентно зв'язана з апоферментом і може легко відділитися від нього;

2) простетична група – небілкова органічна молекула, яка міцно, тобто ковалентно, зв'язана з білковою частиною ферменту і не може бути відділена від неї;

3) іони металів (K^+ , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+}), які називають кофакторами.

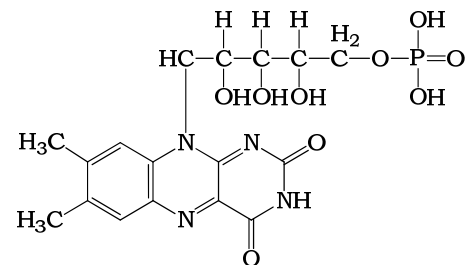
Апофермент у складному ферменті вказує на тип перетворень і відповідає за специфічність дії ферменту. Небілкова частина холоферменту сприяє зв'язуванню ферменту з речовиною, на яку він діє (субстратом), здійснює передачу електронів, атомів, іонів з однієї речовини в іншу. Важливо, що та сама небілкова речовина в одних ферментах може бути зв'язана з білковою міцно (як простетична), а в інших – слабо, і то лише під час реакції (кофермент). Наприклад, ФАД легко відщеплюється від білкової частини оксидази D-амінокислот, а з ферментами тканинного дихання він утворює міцний зв'язок.

Коферменти, або коензими. Кофермент, або коензим, бере участь у перетворенні субстрату, тоді як апофермент визначає специфіку реакції. Коферментами можуть бути різні за природою низькомолекулярні органічні, а також неорганічні речовини (метали), що здатні зв'язуватись із субстратом і видозмінювати його.

Вітаміни як коферменти. Найчастіше коферментами є вітаміни та їхні похідні. Наприклад, пірофосфорний ефір вітаміну B₁ – тіамініпіросфат (ТПФ) – є коферментом піруватдегідрогенази, α-кетоглутарат – дегідрогенази та транскетолази; похідні вітаміну B₂ – флавінмононуклеотид (ФМН), флавінаденідинуклеотид (ФАД) – входять до складу окисдно-відновних ферментів. Сюди ж належать і похідні вітаміну B₃ – нікотинамідаденідинуклеотид (НАД) і нікотинамідаденідинуклеотидфосфат (НАДФ).

Коферментами переамінування та декарбоксилювання амінокислот є похідні вітаміну B₆. Вітамін B₅ є основою для утворення коферменту А (кофермент ацилювання) і пантотейнфосфату – коферменту ацилпереносного білка синтезу жирних кислот.

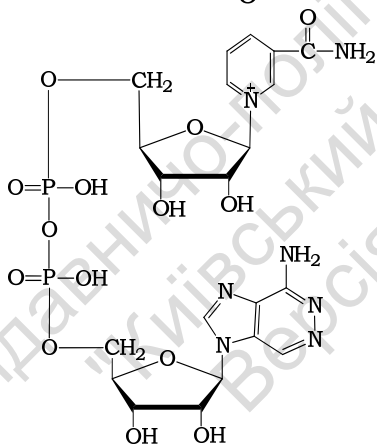
Вітамін B₉ в організмі перетворюється на кофермент ТГФК (5,6,7,8-тетрагідрофолієва кислота), що бере участь у перенесенні одновуглецевих фрагментів. З вітаміну B₁₂ утворюється два коферменти – метилкобаламін і дезоксиаденозилкобаламін, які разом із ТГФК переносять і видозмінюють одновуглецеві фрагменти під час синтезу нуклеїнових кислот у кровотворних органах.



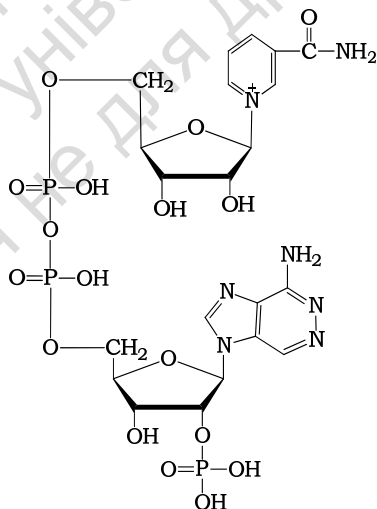
флавінмононуклеотид (ФМН)



флавінаденіндинуклеотид (ФАД)



нікотинаміаденіндинуклеотид (НАД)



нікотинаміаденіндинуклеотидфосфат (НАДФ)

Вітамін Н (біотин) утворює активний кофермент – карбоксибіотин, що бере участь у процесах карбоксилювання.

Роль коферментів можуть відігравати також вітаміноподібні речовини – ліпоєва кислота, убіхінон, карнітин та ін. Перша з них входить до складу піруватдегідрогеназного комплексу і бере участь в окисдно-відновному перетворенні α -кетокислот. Убіхінон служить проміжним переносником електронів і H^+ у дихальному ланцюзі, а карнітин входить як кофермент до складу трансфераз, що переносять залишки жирних кислот крізь мітохондріальну мембрану.

Порфіринові коферменти. Ці коферменти за структурою подібні або навіть тотожні гему в гемоглобіні. Вони містять іони металів, зокрема заліза, які можуть змінювати свою валентність ($Fe^{+2} \rightarrow Fe^{+3}$) і за рахунок цього брати участь у перенесенні електронів під час окисно-відновних процесів. Порфіринові коферменти входять до складу таких ферментів, як цитохроми (b, c, a_1 , a_3), каталаза, пероксидаза та ін. (рис. 5.2).

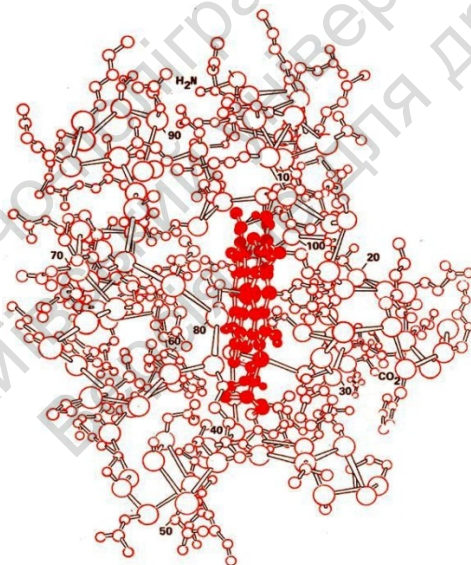


Рис. 5.2. Модель третинної структури цитохрому С.

У центрі молекули показано активний центр – комплекс заліза з органічною сполукою порфірином. Іон заліза, переходячи з двох- у тривалентний стан, і навпаки, може віддавати й отримувати електрони

Нуклеотидні коферменти. Найчастіше коферментами є нуклеозиддифосфати, рідше – нуклеозидмонофосфати. У складі коферментів нуклеозиддифосфати зв'язуються з вуглеводами, ліпідами, амінокислотами тощо. Реакції, у яких беруть участь нуклеотидні коферменти, зводяться до перетворення субстрату в молекулі коферменту, наприклад перетворення УДФ-глюкози на УДФ-галактозу (стереоізомеризація). Нуклеотидні коферменти можуть також виступати в ролі донорів субстратів у реакціях перенесення груп. Так, УДФ-глюкоза є донором глюкози для біосинтезу глікогену, УДФ-глюкуронова кислота – донором залишку глюкуронової кислоти в реакціях кон'югації (наприклад білірубіну). ЦДФ-холін може бути донором холіну під час біосинтезу холінфосфатидів.

Коферменти-метали або металовмісні комплекси. Значна кількість ферментів для своєї дії потребує наявності певних металів. У таких ферментах метали беруть участь в окисно-відновних процесах або відповідають за утворення зв'язку між ферментом і субстратом. Іноді важко з'ясувати, чи даний метал або його іон входить до складу ферменту, чи виконує тільки роль його активатора. В останньому випадку фермент може каталізувати реакцію без металу. Ферменти, що містять у своєму складі метали, без них не будуть виявляти хімічної активності. Нині встановлено, що більш ніж 30 % з відомих ферментів є металовмісними, або металозалежними. Металоферменти зустрічаються в різних класах ферментів.

Іон металу може входити в активний центр ферменту або бути зв'язаним із залишками амінокислот апоферменту, що розміщені на певній відстані від активного центра. Крім участі в окисно-відновних процесах, про що сказано вище, метали сприяють формуванню вищих структур апоферменту, які також необхідні для функціонування ферменту. Ці структури стабілізуються шляхом утворення сольових містків між іонами металів і карбоксильними групами амінокислот. Такі функції здебільшого виконують метали постійної валентності.

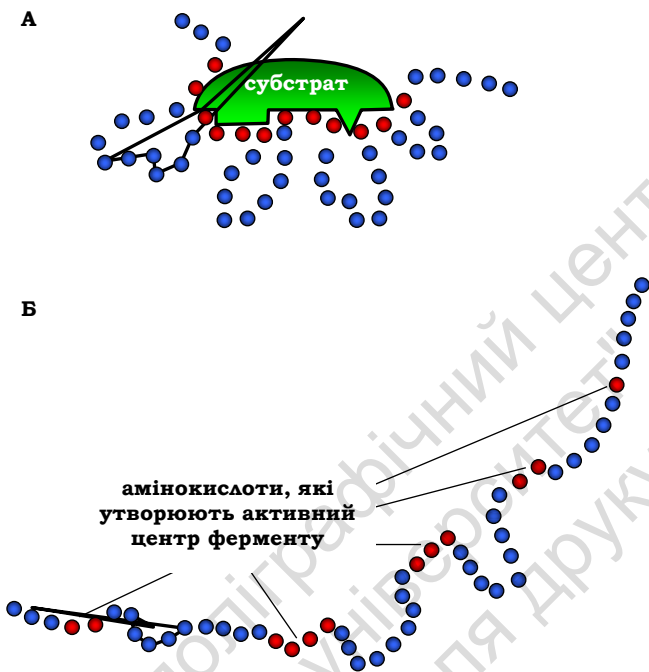
Наприклад, іони кальцію стабілізують α -амілазу, іони цинку – алкогольдегідрогеназу (за відсутності цинку остання дисоціює на субодиниці та втрачає активність). У табл. 5.1 наведено приклади ферментів, що містять як коферменти метали.

Таблиця 5.1. Металоферменти та відповідні метали як коферменти

Металоферменти	Метали
алкогольдегідрогеназа	цинк
аргіназа, амінопептидаза	марганець
аскорбатоксидаза	мідь
ксантиноксидаза	молібден
супероксиддисмутаза	мідь, цинк
фосфатаза	магній
цитохромоксидаза	мідь, залізо

Коферменти-фосфати вуглеводів. Коферментами можуть бути й деякі фосфати вуглеводів. Наприклад, 2,3-дифосфогліцерат є коферментом фосфогліцеромутази, що перетворює під час гліколізу 3-фосфогліцерат на 2-фосфогліцерат. Для деяких ферментів роль коферменту можуть виконувати пептиди. Зокрема, трипептид глутатіон (глутамілцистеїнілглутин), що може перебувати у відновленій або окисненій формі ($-SH$ $HS-$ або $-S-S-$), виконує функцію коферменту для багатьох оксидоредуктаз, наприклад глутатіонпероксидази.

Структурно-функціональні особливості ферментів. Більшість ферментів, оскільки вони є білками, мають чотири рівні структурної організації (первинну, вторинну, третинну і четвертинну), тобто є олігомерами, що складаються із протомерів. Кожна із субодиниць або окремі їхні частини відіграють певну роль у процесі функціонування ферменту. Прості (однокомпонентні) ферменти здійснюють ферментативне перетворення субстрату за участі власне білкової молекули. Безпосередню участь у реакції бере не весь поліпептидний ланцюг ферменту, а тільки незначна його частина, що контактує із субстратом. У ферментативну реакцію включаються тільки кілька залишків амінокислот. Ці залишки можуть розташовуватися в поліпептидному ланцюзі як поруч, так і далеко один від одного, але просторово вони мають бути зближені (рис. 5.3).



**Рис. 5.3. Приєднання субстрату до ферменту (А)
і положення амінокислотних залишків,
які формують активний центр ферменту,
у первинній структурі білка (Б)**

Наприклад, фермент рибонуклеаза, що розщеплює РНК, має структуру, яка скріплюється чотирма дисульфідними зв'язками. У каталітичному центрі ферменту містяться два залишки гістидину, у 12 та 119 положеннях поліпептидного ланцюга, але вони просторово зближені й можуть забезпечувати розрив молекули РНК. Поруч від залишків гістидину є ще 5 залишків основних амінокислот, які, очевидно, можуть фіксувати РНК під час реакції (рис. 5.4).

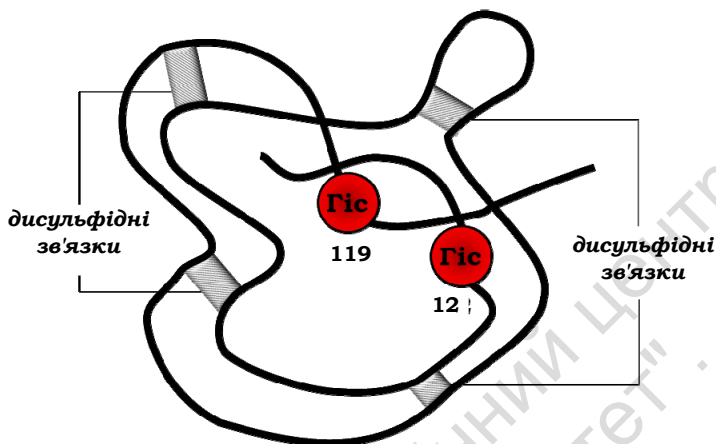


Рис. 5.4. Схема структури рибонуклеази.
Рибонуклеаза – фермент, що гідролізує РНК (за Ж. Крю)

Та частина молекули ферменту, яка з'єднується із субстратом, називається *активним центром ферменту*. Активний центр відповідає за специфічну спорідненість ферменту із субстратом, утворення ферментосубстратного комплексу та каталітичне перетворення субстрату. В активному центрі ферменту умовно розрізняють *каталітичну ділянку*, де відбувається каталітичне перетворення субстрату, і *контактну*, або *якірну ділянку*, що зв'язує фермент із субстратом. Схема розташування складників активного центра показана на рис. 5.5.

За утворення активного центра ферменту, як і за його каталітичну дію, відповідає третинна структура білкової молекули. Отже, при порушенні третинної структури (денатурація) роз'єднуються просторово поєднані амінокислотні залишки та, як наслідок, фермент втрачає активність. У складі активного центра простого ферменту є приблизно 15 залишків амінокислот. Активний центр утворюють залишки таких амінокислот, як серин, цистеїн, гістидин, тирозин, лізин та деякі інші, що надають ферменту як просторової, так і електростатичної спорідненості із субстратом. В утворенні тимчасового комплексу між ферментом і субстратом важлива

роль належить дисульфідним, іонним, а також слабким зв'язкам (водневі зв'язки, гідрофобна взаємодія).

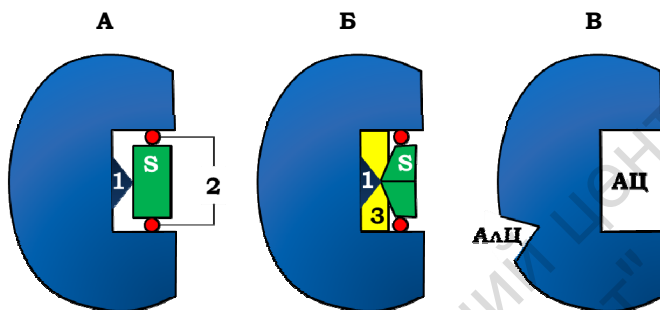


Рис. 5.5. Схема функціональної організації молекули простого (А), двокомпонентного (Б) і алостеричного (В) ферменту:
 Ац – активний центр; S – субстрат; АлЦ – алостеричний (регуляторний) центр;
 1 – каталітична ділянка; 2 – контактна ділянка; 3 – кофактор

Активний центр складних (двокомпонентних) ферментів містить як кофермент, так і ту частину апоферменту, що просторово прилягає до нього. Кофермент при цьому може відповідати за утворення зв'язку із субстратом, формування третинної або четвертинної структури апоферменту та каталітичне перетворення субстрату. Ферменти можуть мати один, два, три або більше активних центрів, що залежить від кількості протомерів (субодиниць), які входять до їхньої структури.

Крім активних, у ферментах можуть бути ще *алостеричні центри* (від грец. *allos* – інший, другий; *steros* – просторовий, структурний). Алостеричні центри служать місцем впливу на фермент різних регуляторних чинників, тому їх ще називають *регуляторними центрами*, а речовини, що взаємодіють з алостеричними центрами, – *ефекторами*. Приєднання до алостеричного центра ефектора зумовлює певні структурні зміни в активному центрі та, як наслідок, – пригнічення або підвищення активності ферменту. Ефекторами можуть

служити продукти ферментативних реакцій, гормони, медіатори нервової системи, метали. Алостеричних центрів (як і активних) фермент може мати кілька, відповідно до кількості протомерів. Важливо зазначити, що алостеричні й активні центри у ферментах просторово відокремлені, тобто містяться один від одного на певній відстані.

Ізоферменти (ізоензими). Ферменти, як і всі інші білки, характеризуються молекулярною гетерогенністю. Зокрема ті з них, що побудовані з кількох субодиниць, можуть існувати в різних молекулярних формах, утворюючи цілі родини. Такі форми зустрічаються в різних тканинах організму й навіть усередині однієї клітини. Уперше це було встановлено на екстрактах із різних тканин, які піддавались електрофорезу в крохмальному гелі з наступним фарбуванням барвниками, специфічними для певного ферменту. Так було виявлено, що на електрофореграмі ферменти дають кілька забарвлених смуг, кількість яких залежить від виду тканини. Наприклад, лактатдегідрогеназа (ЛДГ) утворювала від однієї до п'яти забарвлених смуг залежно від виду тканини, з якої її екстрагували. Отже, у різних тканинах є по кілька молекулярних форм ЛДГ, які діють на той самий субстрат, але відрізняються між собою електрофоретичною рухомістю. Такі ферменти, що каталізують однакову реакцію й містяться в різних тканинах, але відрізняються між собою деякими фізико-хімічними властивостями, наприклад електрофоретичною рухомістю, молекулярною активністю, стабільністю, називаються *ізоферментами*, або *ізоензимами*. В основі відмінностей лежить генетично зумовлена різниця їхньої первинної структури.

Однак форми ферментів, що утворилися внаслідок модифікації первинної структури після завершення синтезу білка, не відносять до ізоферментів. Ізоферменти зазвичай характерні для більшості ферментів, які складаються з кількох субодиниць. Відносно добре вивчені ізоферменти лактатдегідрогенази, малатдегідрогенази, креатинкінази, лужної фосфатази, амінотрансфераз та ін. Розглянемо множинні ізоформи лактатдегідрогенази (ЛДГ), яка каталізує зворотну реакцію перетворення піровиноградної кислоти на молочну за

участю коферменту НАД. На електрофореграмі ЛДГ виявляється п'ять ізоформ, кожна з яких містить по чотири субодиниці, але двох різних типів, які умовно позначають Н-тип (від *heart* – серце) і М-тип (від *muscle* – м'яз).

На рис. 5.6 показано розділення і відносну кількість ізоферментів ЛДГ у різних органах. Екстракти нанесені на лінію, позначену написом "старт".

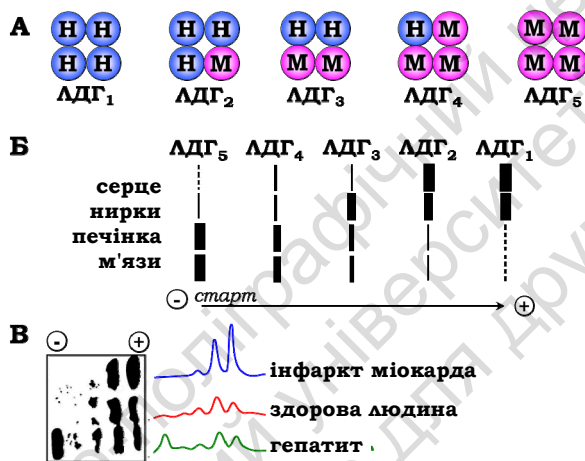


Рис. 5.6. Ізоформи лактатдегідрогенази:

А – будова різних ізоформ ЛДГ;

Б – розподіл на електрофореграмі

й відносні кількості ізоформ ЛДГ у різних органах;

В – вміст ізоформ ЛДГ у плазмі крові в нормі та при патології (електрофореграми – ліворуч, фотометричне сканування – праворуч)

Оскільки Н-субодиниці несуть більш виражений від'ємний заряд за умов електрофорезу ($pH = 8,4$), ніж субодиниці М, то вони з більшою швидкістю рухаються до анода і на фореграмі розташовуються далі від лінії старту. З аналогічної причини ізоферменти, що містять переважно М-протомери, рухаються із малою швидкістю в електричному полі та розташовуються біля катода. Усі інші ізоферменти, що складаються з М- та Н-субодиниць, займають проміжні місця. Таким чином, ЛДГ

має п'ять ізоформ, кожна з яких складається з таких протомерів: ЛДГ₁ (НННН); ЛДГ₂ (НННМ), ЛДГ₃ (ННММ), ЛДГ₄ (НМММ), ЛДГ₅ (ММММ).

Характерно, що кожна тканина в нормі має своє співвідношення форм, свій ізоферментний спектр ЛДГ. За типом ізоферментного спектра ЛДГ біологічні об'єкти поділяються на три групи:

1) з переважним вмістом у спектрі анодних, "швидких" форм (ЛДГ₁ і ЛДГ₂); сюди відносять серце, мозок, нирки, підшлункову залозу, еритроцити;

2) тканини з переважанням ЛДГ₃ (легені, селезінка, лімфовузли);

3) тканини, у яких переважають катодні, "повільні" ізоформи (печінка, скелетні м'язи).

Отже, міокард характеризується високим вмістом ЛДГ₁ та ЛДГ₂ і дуже малим вмістом "повільних" компонентів. Печінка та м'язи, навпаки, містять більше "повільних" ізоформ і зовсім мало "швидких". Вивчення ізоферментного спектра широко використовується в клініці для диференційної діагностики органічних і функціональних уражень органів і тканин, а також установлення топографії патологічного процесу. Ізоферменти відіграють важливу роль у регуляції ферментативної активності, а також у процесі розвитку і диференціації клітин.

Припускають, що не тільки ферменти, але й багато інших білків можуть існувати в клітинах у вигляді численних форм, які є сумішшю різних субодиниць, закодованих різними генами. Величина сумарної активності ферменту в тканинах завжди визначається співвідношенням і сумою окремих ізоформ і залежить від стану організму, вікових особливостей і сторонніх чинників, що діють на організм.

Питання біосинтезу ізоферментів з'ясоване недостатньо. Наявні дані дозволяють припустити, що він змінюється залежно від рівня метаболізму при різних станах організму. Внутрішньоклітинний синтез ізоферментів порушується при недостатчі білків, що потрапляють до організму, а також вітамінів, коферментів, наявності інгібіторів тощо.

За рахунок ізоферментів обмін речовин у тканинах і органах може пристосуватися до дії мінливих внутрішніх і зовнішніх чинників. Кожна тканина має індивідуальний набір ізоферментів, який характеризує специфічність метаболізму в ній і забезпечує оптимальне функціонування всіх її складників.

Функціональні ферментні системи. Функціонально ферменти взаємодоповнюють дію одні одних. Хімічні сполуки іноді під час перетворень переходять крізь довгі ланцюги реакцій, у яких беруть участь багато ферментів послідовно. Нерідко в таких численних перетвореннях продукти першої реакції служать субстратом для наступної. Сукупність таких реакцій створює метаболічні шляхи, що характеризують перетворення вуглеводів, жирних кислот, кетокислот тощо.

Ферменти, функціонально пов'язані між собою при перетворенні певних субстратів і розміщені в однакових органелах клітини, називають *функціональними ферментними системами*, або *надмолекулярними ферментними асоціаціями*. Прикладом таких систем можуть бути ферменти, що беруть участь у розщепленні глюкози до піровиноградної або молочної кислоти. Сюди відносять і ферменти, що окиснюють жирні кислоти в циклі Кноопа до ацетил-КоА. Кожна ланка в цих ланцюгах перетворень каталізується певним ферментом, а зв'язок між сусідніми реакціями реалізується через проміжні метаболіти.

Окремі ферментні системи асоційовані між собою не тільки функціонально, але і структурно. До них можна віднести, наприклад, поліферментний комплекс піруватдегідрогенази, що включає кілька ферментів, які через кілька стадій здійснюють окиснення піровиноградної кислоти. Подібною є також система синтезу жирних кислот, до якої входять сім структурно об'єднаних ферментів, що виконують спільну функцію – синтез жирних кислот.

Деякі структурно-функціональні асоціації ферментів закріплюються на мембрані й утворюють своєрідні ланцюги (конвеєри) ферментів, якими, з метою вилучення енергії, передаються електрони та атоми H^+ . Поліферментні структурно-функціональні системи в клітинах досить поширені, вони

виконують біологічно важливі функції та мають переваги над неасоційованими ферментами: скорочуються відстані, на які переносяться метаболіти в ізольованих ферментних реакціях, вони менш енергоємні, чутливіші до регуляторних впливів.

Властивості ферментів як каталізаторів. Ферменти мають низку властивостей, подібних до небіологічних каталізаторів, але одночасно суттєво відрізняються від них.

Спільним для всіх видів каталізаторів є:

1) вони пришвидшують тільки ті реакції, які можливі за законами термодинаміки, тобто ті процеси, що йдуть у напрямку термодинамічної рівноваги, але з малою швидкістю;

2) не змінюють напрямку реакції;

3) каталізатори збільшують швидкість наближення системи до термодинамічної рівноваги, не змінюючи при цьому точки рівноваги;

4) відносно не змінюються після реакції, тобто вивільняються та знову можуть реагувати з наступними молекулами субстрату;

5) усі каталізатори діють у відносно малих концентраціях.

Водночас ферменти як білкові структури мають властивості, відмінні від властивостей неорганічних каталізаторів. Для ферментів характерні специфічність, чутливість до дії сторонніх чинників, залежність від рН і температури. На противагу іншим каталізаторам, їм притаманна значно вища каталітична активність.

Специфічність дії ферментів. Специфічність є характерною рисою, що відрізняє ферменти від небіологічних каталізаторів. Наприклад, дрібнодисперсна платина, залізо чи нікель можуть бути каталізаторами розкладу перекису водню на воду й кисень. Серед ферментів таку дію виявляє переважно каталаза. Таким чином, ферментам притаманна виражена специфічність дії. Кожен фермент діє на певний субстрат або певну групу близьких за структурою субстратів чи певний тип зв'язків у молекулі.

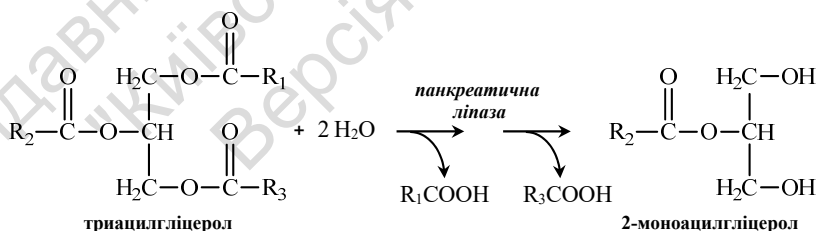
Висока специфічність дії ферментів зумовлена конформаційною й електростатичною комплементарністю між молекулами субстрату й ферменту, а також особливістю структури активного центра ферменту, що забезпечує високу

спорідненість із субстратом і вибірковість перебігу однієї реакції серед багатьох інших, які здійснюються в клітині. В активному центрі є функціональні групи для зв'язування відповідного специфічного субстрату, а також компоненти, що перетворюють субстрат на продукт реакції. Таку властивість називають *субстратною специфічністю ферменту*. Завдяки специфічності ферменти не тільки пришвидшують перетворення субстратів, але й визначають напрямок метаболічного процесу.

Ферменти можуть виявляти відносну (групову), абсолютну та просторову (стерео-) специфічність.

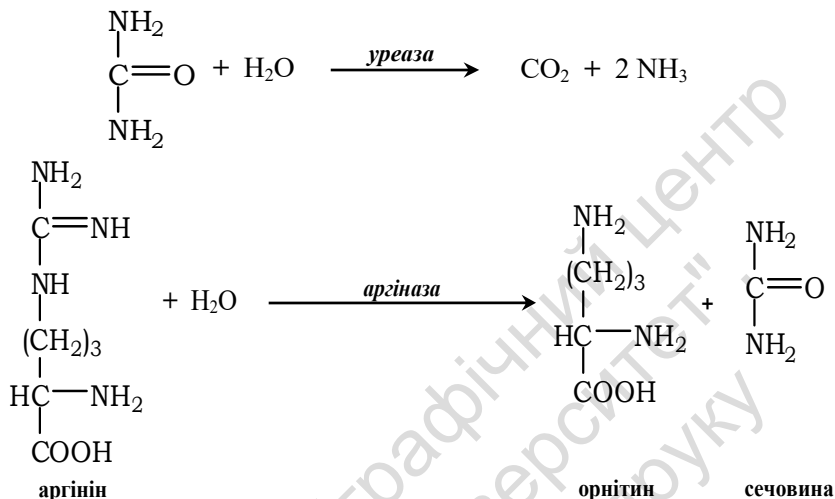
Ферментами з відотною специфічністю є фосфатази, ліпази, протеази та ін. Фосфатази здатні гідролізувати різні фосфороорганічні сполуки, наприклад β -гліцерофосфат, глюкозо-6-фосфат, холінфосфат; ліпаза розщеплює різні жири тваринного та рослинного походження; протеази (пепсин, трипсин та ін.) також гідролітично розщеплюють пептидні зв'язки в білкових молекулах.

Відносна специфічність властива переважно ферментам травної системи, що має важливе біологічне значення, оскільки суттєво зменшує засоби впливу на субстрати. Наприклад, фермент панкреатична ліпаза каталізує гідроліз жирів у дванадцятипалій кишці людини, тобто перетворення будь-якої молекули жиру (триацилгліцеролу) до молекули 2-моноацилгліцеролу та двох молекул вищих жирних кислот:

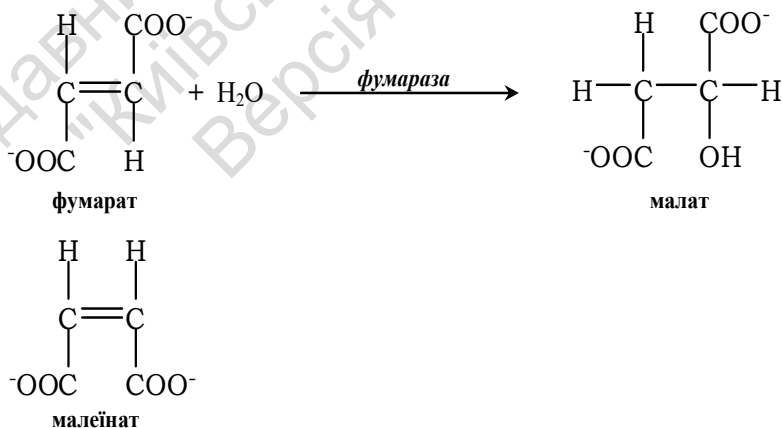


Велика кількість ферментів характеризується *абсолютною специфічністю*, тобто здатністю перетворювати тільки один субстрат. Прикладом таких ферментів може служити фермент уреаза, що каталізує перетворення сечовини, але не впливає на метилсечовину; фермент аргіназа перетворює аргінін, але не

діє на метиларгінін; сукцинатдегідрогеназа окиснює сукцинат, але не діє на малеат:



Усій групі ферментів притаманна *стереоспецифічність*, тобто здатність впливати на один зі стереоізомерів, наприклад на D- або L-ізомер. Так, ферменти, що каталізують перетворення вуглеводів, діють тільки на D-ізомери, але не впливають на L-ізомери; фермент фумараза каталізує перетворення фумарової кислоти, яка є транс-ізомером, але не діє на цис-ізомер – малеїнову кислоту:



Залежність швидкості ферментативної реакції від температури. Підвищення температури завжди збільшує швидкість хімічних реакцій, зокрема ферментативних. Як показник зростання швидкості реакції використовують температурний коефіцієнт Вант-Гофа Q_{10} , що вказує на зростання швидкості реакції при підвищенні температури на $10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Для хімічних процесів, каталізованих небіологічними каталізаторами, величина цього коефіцієнта дорівнює 2, що означає збільшення швидкості реакції вдвічі при зростанні температури на $10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Однак для ферментативних процесів така закономірність існує тільки в діапазоні низьких температур – до $50\text{--}60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Вище цих температур відбувається денатурація ферменту та, як наслідок, зниження активності. Оптимальні значення температури для більшості ферментів перебувають у межах $20\text{--}40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Сумарна швидкість ферментативної реакції при зміні температури середовища є результуючою від складання двох швидкостей – зростання швидкості у відповідь на підвищення температури та її зниження як функції денатурації білка-ферменту. Сумація цих двох швидкостей для більшості ферментів теплокровних істот дає найбільше значення швидкості за температури $37\text{--}40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Температура, за якої швидкість ферментативної реакції максимальна, називається *температурним оптимумом* (рис. 5.7). Треба мати на увазі, що його величина залежить також від тривалості дії температури на фермент. Фермент може переносити високу температуру протягом короткого часу, у цей період активність його значно підвищується. Однак тривале перебування ферменту за високої температури призводить до його денатурації та зниження активності.

Низькі температури також впливають на активність ферментів, але, на противагу високим, вони інгібують їхню дію, не руйнуючи структури. Перенесення ферментів із низьких температур в оптимальні повністю (у більшості випадків) відновлює їхню активність. Цю властивість застосовують у біології та медицині. Охолодження біологічних рідин, тканин,

органів використовують для пригнічення в них метаболічних процесів і попередження автокаталітичного розщеплення.

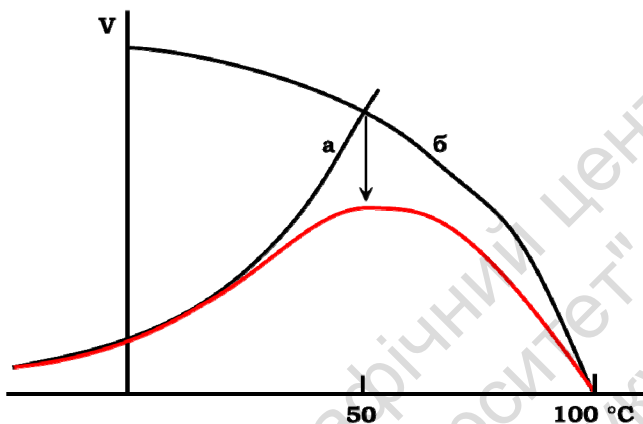


Рис. 5.7. Вплив температури на швидкість реакції, яка каталізується ферментом:

- а – підвищення швидкості реакції як функція температури;
- б – зниження швидкості реакції як функція денатурації білка-ферменту;
- стрілка вказує на оптимум температури

Температурний оптимум 37–40 °C для більшості ферментів теплокровних тварин і людини, очевидно, створює найкращі умови для існування структурної й електростатичної спорідненості між активним центром ферменту та його субстратом, необхідним для їх взаємодії. Однак зустрічаються ферменти, що не руйнуються за значно вищих температур і зберігають ферментативну активність. Наприклад, лужна фосфатаза печінки стабільна за температури 50 °C, а фермент м'язів міокіназа витримує навіть +100 °C. На активність ферментів впливають також концентрація субстрату, рН середовища тощо.

Залежність активності ферментів від рН середовища. Якщо активність ферментів визначати за різних значень рН, то графік залежності матиме вигляд куполоподібної кривої (рис. 5.8). Крива може бути симетрична, з однаковим підйомом і

спуском у кислому й лужному середовищах, або йти на зниження в якійсь одній ділянці.

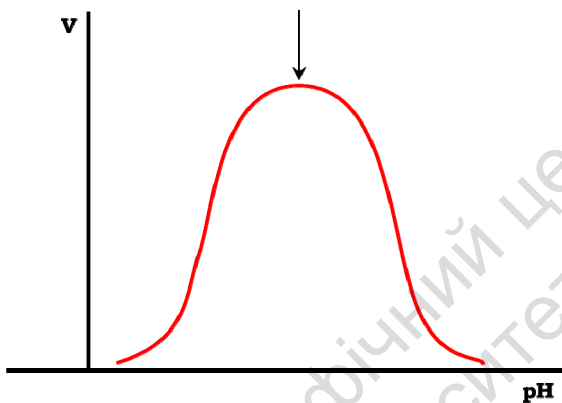


Рис. 5.8. Вплив pH на швидкість реакції, яка каталізується ферментом (стрілка вказує на оптимум pH)

Значення pH, за якого активність ферменту найвища, називається *pH-оптимумом ферменту*. Зазвичай ферменти найактивніші в межах вузької зони pH, яка для більшості з них становить 6–8. Деякі внутрішньоклітинні ферменти найкраще функціонують у нейтральному середовищі, а для ферментів шлунково-кишкового тракту pH-оптимум може перебувати в зоні від нейтрального до сильно кислого і лужного. Наприклад, пепсин має оптимум pH 1,5–2,5, трипсин – pH 8,0–9,0. Для виявлення залежності активності ферменту від концентрації водневих іонів експерименти проводять за оптимальної температури, достатньо високих концентрацій субстрату, але за різних значень pH.

Чутливість активності ферментів до зміни pH середовища, очевидно, пов'язана з тим, що фермент, залежно від середовища, може бути в іонізованій або неіонізованій формі, що обов'язково відображатиметься на третинній структурі білка, зокрема при формуванні активного центра й утворенні ферментосубстратного комплексу. Безумовно, різне значення

pH по-різному впливатиме й на стан іонізації кофакторів і субстратів.

Можна стверджувати, що саме за pH-оптимуму між субстратом і ферментом існує найкраща просторова й електростатична комплементарність, яка забезпечує їх зв'язування, утворення ферментосубстратного комплексу та його подальше перетворення.

Запитання для самоконтролю

1. Наведіть приклади ферментативних процесів, що здавна використовувались людьми.
2. Опишіть загальні властивості ферментів.
3. Поясніть, що таке кофактори, і наведіть їхні типи. Наявність останніх є перевагою чи недоліком при використанні ферментів?
4. Що таке холофермент?
5. Наведіть приклади вітамінів – попередників коферментів.
6. Який метал необхідний для функціонування α -амілази (алкогольдегідрогенази)?
7. Що таке однокомпонентні ферменти?
8. Які рівні структурної організації білка відповідають за формування активного центра?
9. Які амінокислоти часто зустрічаються в активних центрах ензимів?
10. Які зв'язки зазвичай стабілізують ферментосубстратний комплекс?
11. Чи правильне твердження, що одному ферменту відповідає один активний і один алостеричний центр?
12. Наведіть приклади ферментів, що мають ізоформи.
13. Навіщо, на вашу думку, в організмі є різні форми того самого ензиму?
14. Якими параметрами відрізняються біологічні каталізатори від хімічних?
15. Наведіть приклад ферментів з відносною специфічністю.
16. У яких межах лежать значення оптимуму температур для ферментів? Чому?

17. Чи завжди графік залежності активності ферменту від рН симетричний?

18. Охарактеризуйте рН оптимуму внутрішньо- і позаклітинних ферментів ссавців.

5.2. Механізми та регуляція перебігу ферментативних реакцій

Енергетичні особливості ферментативних реакцій. Для того щоб відбувалася реакція, реагуючим молекулам потрібен певний запас енергії.

Ферменти, також як інші каталізатори, прискорюють тільки ті реакції, які термодинамічно можливі, тобто відбуваються довільно, але з дуже малою швидкістю. Можливість перебігу хімічної реакції визначається різницею між вільною енергією початкових речовин і продуктів реакції. Якщо вільна енергія продуктів реакції менша, ніж початкових речовин, тобто відбувається розсіювання енергії, то реакція перебігає довільно – вона термодинамічно можлива. У випадку переважання вільної енергії продуктів реакції над вихідними речовинами реакція енергетично стає неможливою. Вона може здійснюватись тільки за умов надходження зовнішньої енергії в кількості, більшій за енергію утворюваних продуктів.

Швидкість будь-якої реакції залежить від величини енергетичного бар'єра, який необхідно подолати реагуючим молекулам, але для різних реакцій величина його неоднакова. У звичайних умовах (за відсутності каталізатора, ферменту або за низьких температур) є дуже мала кількість молекул, здатних подолати цей бар'єр і вступити в реакцію. Отже, без каталізаторів і за низьких температур швидкість реакції буде низькою.

Здатність молекул вступати в хімічну реакцію визначається енергією активації, яка витрачається на перемагання сил відштовхування, що виникають між електронними хмарами взаємодіючих молекул. Інакше кажучи, енергія активації витрачається на утворення проміжного комплексу між реагуючими молекулами.

Механізм ферментативних реакцій. За всю історію розвитку вчення про ферменти було запропоновано багато гіпотез, що пояснювали механізм їх дії. Більшість із них мають суто історичний характер і не витримали випробувань новими даними про структуру ферментів та їхні активні й алостеричні центри. Заслуговує на увагу гіпотеза, запропонована на початку XX ст. Варбургом і Бейлісом. Її значення полягає в тому, що вона пов'язувала механізм дії ферментів із дією неорганічних каталізаторів. Ця гіпотеза пояснювала, що поверхня ферменту служить місцем для адсорбції реагентів. За цих умов різко зростає кількість молекул субстрату, що припадає на одиницю площі ферменту, а отже, за законом діючих мас зростає і швидкість реакції. Також припускалося, що в результаті зв'язування субстрату з активним центром ферменту відбуваються механічні зміни молекул субстрату, що зумовлює більшу реакційну здатність (рис. 5.9). Однак адсорбційна гіпотеза не могла пояснити специфічності дії ферментів.

Для пояснення специфічності дії ферментів у 1894 р. Е. Фішер запропонував гіпотезу, яку ще й досі називають *гіпотезою ключа і замка*, або *гіпотезою шаблону*.

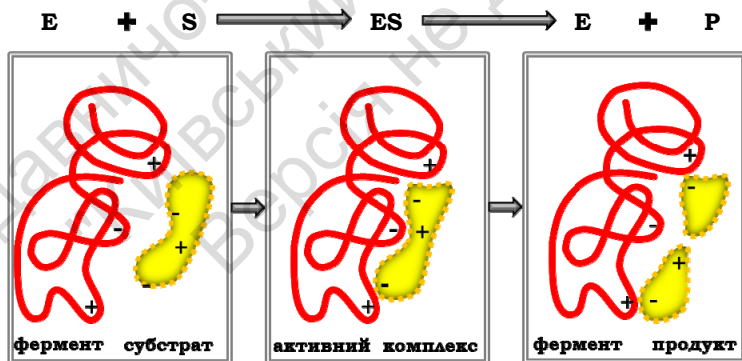


Рис. 5.9. Механізм дії ферментів.

Субстрат зв'язується з активним центром у кількох точках; комплекс, що утворився таким чином, нестабільний, після перебігання хімічної реакції він розщеплюється з утворенням продуктів і вільного ферменту

В основі специфічності, за цією гіпотезою, лежить жорстка просторова відповідність субстрату й активного центра ферменту (рис. 5.10). За Е. Фішером, реакція можлива тільки в тому випадку, якщо просторово субстрат підходить до ферменту, як ключ до замка. Якщо субстрат просторово відрізняється від структури активного центра ферменту, то реакція не відбувається.



Рис. 5.10. Механізм дії ферментів (гіпотеза Фішера).

Активний центр ферменту (замок)

здатний прийняти тільки субстрат специфічної форми (ключ)

Однак і ця гіпотеза (її ще називають *гіпотезою відповідності*) не може пояснити різні види специфічності, оскільки важко уявити ситуацію, коли кілька ключів (субстратів) підходять до одного замка (ферменту). Тому вона була замінена й доповнена *гіпотезою вимушеної відповідності (індукованої адаптації ферменту до субстрату)*. Згідно з цією гіпотезою, конфігурація ферменту і його активного центра гнучка, еластична і змінюється під впливом субстрату, який індукує у ферменті зміни конфігурації молекул відповідно до власної структури, тобто "замкова щілина", за Кошландом, виготовлена з еластичного матеріалу, тому певною мірою набуває форми "ключа" при контакті з ним. Однак приєднання субстрату до ферменту може викликати зміни активного центра, за яких останній утворює із субстратом неактивний комплекс; тоді реакція не відбувається. На схемі зображені зміни структури активного центра ферменту, що можуть викликатись субстратом (рис. 5.11).

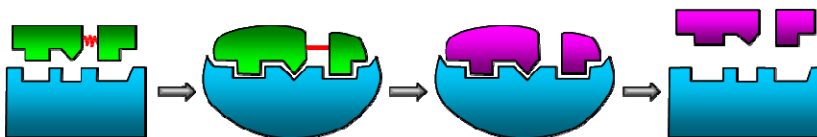


Рис. 5.11. Механізм дії ферментів (гіпотеза Кошланда).
Процес приєднання субстрату індукує специфічні конформаційні зміни в активному центрі

Значну роль у вивченні механізму взаємодії ферменту і субстрату відіграли класичні праці Міхаеліса і Ментен, опубліковані в 1913 р., про ферментосубстратні комплекси. Згідно з гіпотезою Міхаеліса – Ментен, ферментативна реакція завжди супроводжується утворенням проміжної короточасної сполуки – ферментосубстратного комплексу. Процес утворення комплексу описується рівнянням і перебігає в кілька стадій, кожна з яких має власні особливості:

- перша стадія – зв'язування субстрату з активним центром ферменту, тобто утворення ферментосубстратного комплексу (ES);
- друга стадія – перетворення первинного ферментосубстратного комплексу на один або кілька проміжних ферментосубстратних комплексів (ES^x та ES^{xx});
- третя стадія – відокремлення продуктів реакції від активного центра ферменту і вивільнення ферменту та продукту (E та P).

Перша стадія найкоротша: вона перебігає майже миттєво. За цей час субстрат орієнтується навколо активного центра й утворює з ним короточасну неміцну проміжну сполуку. На другій стадії, яка перебігає найповільніше, відбуваються розхитування зв'язків у молекулі субстрату, розрив їх та утворення нових із каталітичним центром ферменту. Знижується енергія активації субстрату, що зумовлює зростання швидкості його перетворення. Третя стадія за тривалістю наближається до першої, швидкість її перебігу залежить від дифузії продукту в середовище.

Достовірність утворення ферментосубстратного комплексу, постульованого вперше Міхаелісом, зараз доведена

експериментально, математичними методами, ЕПР та ЯМР. Перші докази існування ферментосубстратного комплексу були одержані в лабораторії Кейліна і Чанса. Сучасні методи дослідження дозволяють визначити для низки ферментативних реакцій константи швидкості утворення ферментосубстратних комплексів та їх дисоціації на фермент і продукти.

Установлено, що в утворенні ферментосубстратних комплексів беруть участь водневі зв'язки, електростатичні та гідрофобні взаємодії. Досліджуючи рівняння Міхаеліса – Ментен, можна також вивчити кінетику ферментативних реакцій, установити порядок реакції та стежити за впливом різних чинників на перебіг ферментативного процесу. Загалом прискорення хімічних реакцій відбувається завдяки тому, що ферменти забезпечують правильну орієнтацію молекули субстрату біля каталітичного центра, надають для каталізу протон-донорні та протон-акцепторні групи, утворюють за допомогою ковалентних зв'язків нестабільні проміжні сполуки із субстратом і викликають напруження в молекулі субстрату або її деформацію.

Кінетика ферментативних реакцій. Основи кінетики ферментативних процесів були закладені в працях Міхаеліса і Ментен, зокрема в рівнянні, що описує утворення й розпад ферментосубстратного комплексу.

Під кінетикою ферментативних процесів розуміють розділ науки про ферменти, що вивчає залежність швидкості ферментативної реакції від хімічної природи субстрату, умов середовища, а також сторонніх чинників, які впливають на перебіг реакції.

Коли концентрація субстрату досить велика, вона вже не впливає на швидкість, оскільки остання стає максимальною (свідчення того, що весь фермент зв'язаний із субстратом). Графічно залежність швидкості реакції від концентрації субстрату описується гіперболою, яку називають *кривою Міхаеліса* (рис. 5.12).

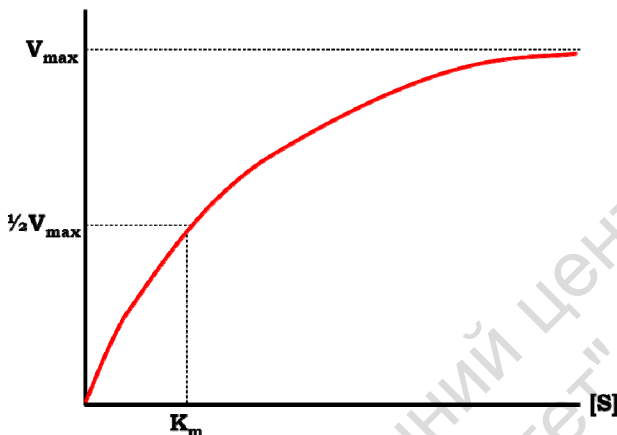


Рис. 5.12. Крива насичення хімічної реакції, яка ілюструє співвідношення між концентрацією субстрату $[S]$ і швидкістю реакції: $V_{\max}$ – максимальна швидкість реакції; K_m – константа Міхаеліса

Форма кривої показує, що зі збільшенням концентрації субстрату всі активні центри ферменту насичуються. Це досягається за певної концентрації ферменту та субстрату і відповідає максимально можливій швидкості реакції. Як видно з графіка, за низьких концентрацій субстрату ферментативна реакція відбувається за першим порядком, тобто швидкість зростання її залежить від концентрації однієї речовини – субстрату. В умовах високої концентрації субстрату за незмінної кількості ферменту реакція перебігає за нульовим порядком, тобто зміна концентрації першого не впливає на перебіг процесу. Швидкість реакції за цих умов максимальна, оскільки всі активні центри ферменту зв'язані із субстратом.

Дослідження активності ферментів проводять за великих концентрацій субстратів (нульовий порядок реакції, тобто за умов насичення). У таких умовах усі зміни швидкості реакції залежатимуть тільки від ферменту. Однак у живих клітинах концентрації субстрату зазвичай далекі від значень насичення. Це означає, що ферменти в клітинах використовують не всю свою потужність.

Дія модуляторів на ферменти. Активність ферментів може змінюватись не тільки при зміні кількості субстрату, ферменту, рН середовища, але й під дією різних хімічних речовин. Речовини, що впливають на хід ферментативних реакцій, називаються їх *модуляторами*, або *ефекторами*. Вони поділяються на активатори та інгібітори, тобто під їх впливом реакція може прискорюватись або сповільнюватись. Вивчення дії модуляторів ферментів має практичне значення, оскільки дозволяє глибше зрозуміти природу дії ферментів. Деякі з них відіграють роль природних регуляторів метаболізму. Існує багато типів модуляторів активності ферментів, що відрізняються між собою за будовою та механізмом дії.

Активатори ферментів. Роль активаторів можуть відігравати як органічні (жовчні кислоти, проміжні метаболіти та ін.), так і неорганічні речовини (іони металів, аніони). Нерідко зустрічаються випадки, коли та сама речовина стосовно одного ферменту є активатором, а щодо іншого – інгібітором. Іони металів бувають досить специфічними активаторами для певних ферментів. Вони можуть сприяти приєднанню субстрату до ферменту, брати участь у формуванні третинної структури ферменту або бути складовою активного центра. Іони багатьох металів (натрію, калію, кальцію, магнію, заліза, міді та ін.) є обов'язковими компонентами, що необхідні для нормального функціонування багатьох ферментів. Іноді для деяких ферментів потрібно кілька різних іонів. Наприклад, для Na^+, K^+ -АТФази, що здійснює транспорт іонів через плазматичну мембрану, потрібні для нормального функціонування іони калію, натрію та магнію.

Аніони, порівняно з катіонами, рідше є активаторами ферментів. Прикладами активуючої дії аніонів можуть бути аніони хлору для пепсину й амілази слини; аніони галогенів – для аденілатциклази; жовчні кислоти – для панкреатичної ліпази. Деякі ферменти виявляють активуючу дію стосовно своїх неактивних форм (автокаталіз). Наприклад, пепсин – відносно пепсиногену, трипсин – щодо трипсиногену тощо. Деякі ферменти активують зовсім інші ферменти. Так, ентерокиназа шляхом відщеплення інгібітору перетворює неактивний трипсиноген на активний трипсин, а останній

перетворює хімотрипсиноген на хімотрипсин. Активаторами можуть бути такі органічні сполуки, як цистеїн, відновлений глутатіон та інші, що мають вільну SH-групу. Ці сполуки здатні відновлювати дисульфідні зв'язки в неактивних ферментах до сульфгідрильних груп і тим самим перетворювати ферменти на активні форми. Таким чином речовини з вільними SH-групами захищають ферменти від агресивних хімічних впливів, наприклад від окиснення, і тому є активаторами ферментів.

Існує група ферментів, що активуються за допомогою циклічного АМФ (рис. 5.13).

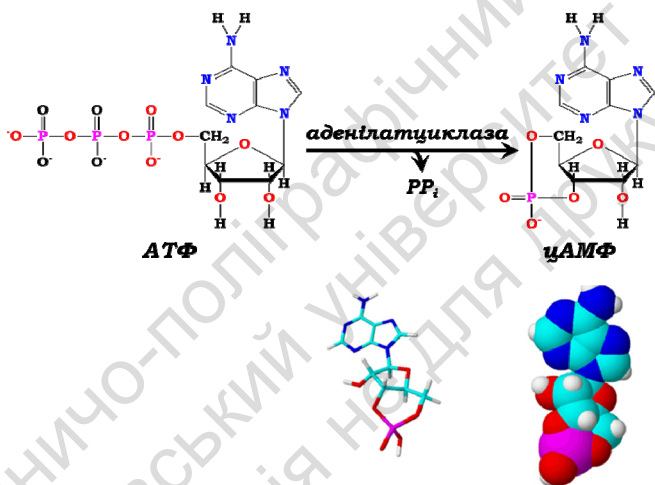


Рис. 5.13. Циклічний аденозинмонофосфат (циклічний АМФ, 3',5'-цАМФ) – похідне АТФ

Активація деяких ферментів залежить від процесів фосфорилування та дефосфорилування. Так, фосфорилаза, що відщеплює від глікогену одну молекулу глюкози, виявляє свою дію тільки у фосфорильованому стані (фосфорилаза А), у нефосфорильованому стані (фосфорилаза В) вона неактивна. Аналогічно ліпаза жирової тканини значно інтенсивніше виявляє активність у фосфорильованому стані.

Фосфорилування цих ферментів здійснюється за рахунок АТФ за участі протеїнкіназ. Механізм активації цАМФ-залежної протеїнкінази такий: вона складається із двох субодиниць – каталітичної, що містить активний центр, і регуляторної, у якій розміщений центр зв'язування циклічного АМФ. Фермент неактивний, оскільки його активний центр закритий. Він звільняється тільки при взаємодії цАМФ і регуляторного центра ферменту.

Дефосфорилування фосфорильованої ліпази здійснюється під впливом фосфопроотеїнфосфатази.

Деякі ферменти, навпаки, виявляють каталітичну дію тільки в нефосфорильованому стані, а фосфорилування призводить до втрати їхньої активності. Прикладом може служити фермент глікогенсинтаза. За допомогою поєднаної дії ферментів протеїнкіназ і фосфатаз певні ферменти можуть переходити з неактивного стану в активний і навпаки, що має важливе значення в регуляції метаболічних процесів.

В основі активації ферментів лежать різні механізми. Серед них можна назвати такі:

1. активація за допомогою впливу на активний центр;
2. активація шляхом відщеплення від ферменту частини пептидного ланцюга або якоїсь неорганічної сполуки, що закривала активний центр;
3. активація шляхом приєднання до ферменту якоїсь модифікуючої сполуки;
4. активація шляхом дисоціації неактивного комплексу ферменту на субодиниці, одна з яких виявляє властивості ферменту.

Інгібітори ферментів. Подібно до активаторів, інгібуючу дію на ферменти можуть виявляти різні за будовою та механізмом дії речовини. Вивчення різних інгібіторів відкриває великі можливості для розуміння механізмів дії ферментів. Інгібітори (від лат. *inhibere* – затримувати, гальмувати) – речовини, що, на відміну від активаторів, послаблюють або цілком призупиняють дію ферментів. Деякі інгібітори ферментів є отрутою для живих організмів (наприклад ціаніди, сірководень, монооксид

вуглецю). Деякі лікарські засоби також мають виражені інгібуючі властивості щодо певних ферментних систем. Тому інгібітори широко застосовують у експериментальній медицині для з'ясування механізму дії лікарських препаратів.

За механізмом дії інгібітори поділяються на дві групи:

1) інгібітори, що вступають із ферментами у зворотну реакцію;

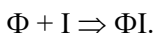
2) інгібітори, що реагують із ферментами незворотно.

Незворотний інгібітор утворює з ферментом міцну сполуку за рахунок ковалентних зв'язків. Ці зв'язки виникають між різними функціональними групами, що поєднуються з активним центром ферменту. Такий комплекс не розпадається і не дисоціює на вихідні речовини, наприклад ціанідна кислота та її похідні, фосфороорганічні, тіолові отрути та ін.

Деякі незворотні інгібітори руйнують структуру молекули ферменту, тому їх ще називають *денатурантами*. Вони є неспецифічними інгібіторами для всіх ферментів. До них належать солі важких металів (свинець, ртуть, срібло). Зворотні інгібітори пригнічують реакцію, але не викликають значних змін у структурі молекули ферменту. Розрізняють три типи зворотного інгібування ферментів: *конкурентне*, *неконкурентне* і *безконкурентне*.

Конкурентне інгібування. Конкурентні інгібітори здатні зворотно зв'язуватися з активним центром ферменту та конкурувати із субстратом за активний центр. Такі інгібітори часто є структурними аналогами субстрату і тому комплементарні активному центрові ферменту.

Якщо активний центр ферменту зв'язується з інгібітором, то він не зможе вступати в реакцію із субстратом. За наявності субстрату (С) та інгібітору (І) одночасно відбуваються дві реакції:



Та сполука, концентрація молекул якої більша, буде переважно сполучатися з активним центром і визначати напрямок реакції (рис. 5.14). Зняти гальмівний вплив інгібітору можна надлишком субстрату, який витіснить інгібітор з активних центрів молекул ферменту. Конкурентне інгібування називають ще *ізостеричним*. Воно викликається речовинами, які за структурою близькі до субстратів.

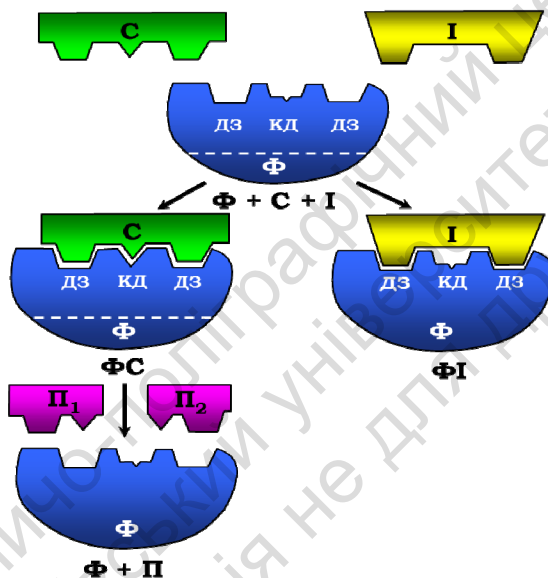


Рис. 5.14. Схема конкурентного інгібування активності ферменту:
ДЗ – ділянка зв'язування; КД – каталітична ділянка

Прикладом конкурентного гальмування є пригнічення малонатом активності сукцинатдегідрогенази – ферменту, що окиснює сукцинат, який при цьому перетворюється на фумарат (рис. 5.15).

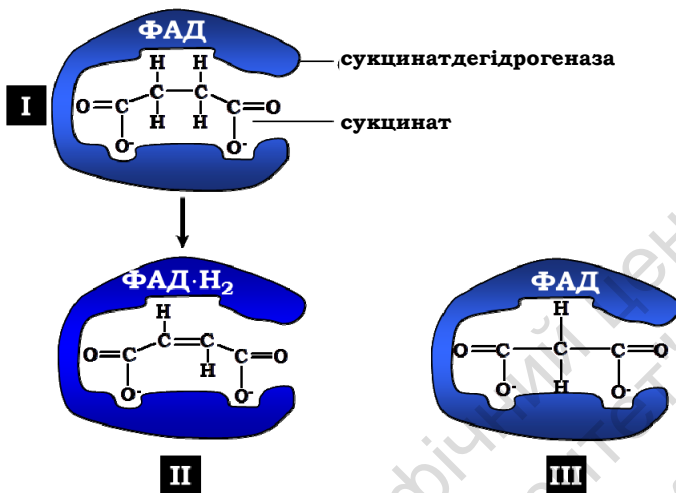


Рис. 5.15. Приклад конкурентного інгібування сукцинатдегідрогенази маленовою кислотою: I – сукцинат зв'язується з активним центром ферменту сукцинатдегідрогенази;

II – під час ферментативної реакції відбувається відщеплення двох атомів водню від сукцинату й приєднання їх до коферменту ФАД. У результаті утворюється фумарат, який звільняється з активного центра сукцинатдегідрогенази;

III – маленова кислота – структурний аналог сукцинату, вона також зв'язується з активним центром сукцинатдегідрогенази.

При цьому хімічна реакція не відбувається

Якщо в середовище, де відбувається окиснення сукцинату, внести маленову кислоту (інгібітор сукцинатдегідрогенази), яка за структурою дуже подібна до сукцинату й відрізняється від нього тільки тим, що містить одну групу CH_2 , то утвориться фермент-інгібіторний комплекс, який не здатний окиснюватись, тобто два атоми водню не відщеплюються. У результаті приєднання малонату до ферменту реакція окиснення сукцинату загальмовується. Отже, сукцинат і малонат як близькі за структурою речовини конкурують за зв'язування з активним центром ферменту. Тому напрямок реакції буде визначатися співвідношенням концентрацій

субстрату й інгібітору. Інакше кажучи, якщо в середовищі одночасно наявні субстрат та інгібітор, то у випадку переважання концентрації інгібітору реакція загальмується, а щоб зупинити його гальмівну дію, потрібно внести надлишок субстрату. Останній за законом діючих мас витіснить із комплексу інгібітор, і реакція відновиться. Таку ж конкурентну дію на сукцинатдегідрогенезу виявляє й оксалоацетат, який також близький за структурою до сукцинату.

На рис. 5.16 зображена тривимірна структура протеази вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ), яка розщеплює синтезований загальний поліпептид ВІЛ на окремі функціональні білки. Якщо цю протеазу інгібувати, то блокується складання нових вірусних частинок.

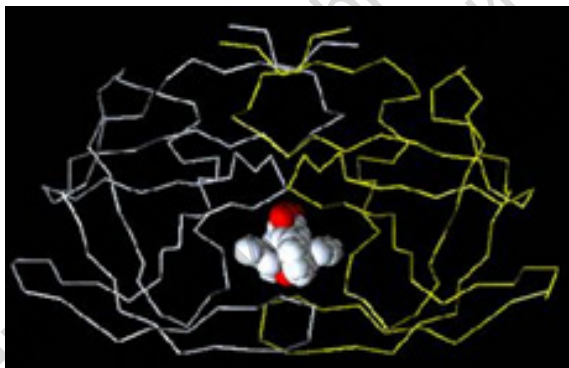


Рис. 5.16. Тривимірна структура протеази вірусу імунодефіциту людини

Конкурентне інгібування широко застосовується в медичній практиці для боротьби з інфекціями, у сільському господарстві – для знищення шкідників.

Конкурентними інгібіторами (ізостеричними) можуть бути проміжні продукти обміну – метаболіти, накопичення яких регулює активність ферментів. Дія багатьох лікарських посередників відбувається за принципом конкурентного інгібування. Наприклад, сульфаніламід, що широко застосовується для лікування інфекційних захворювань, структурно подібний до параамінобензойної кислоти (ПАБК), яку

бактерії використовують для синтезу фолієвої кислоти. Остання входить до складу ферментів, необхідних для бактеріального росту. Сульфаніламід витісняють ПАБК із комплексу з ферментом, що призводить до гальмування росту бактерій.

Конкурентну дію виявляють також деякі аналоги вітамінів. Наприклад, дезоксипіридоксин – аналог вітаміну B₅ або аміноптерин – аналог фолієвої кислоти. Ці аналоги вітамінів називаються ще антивітамінами. Вони можуть утворювати антикоферменти, що виявляють властивості конкурентних інгібіторів. Антикоферменти або їх попередники антивітаміни застосовуються в біохімічних дослідженнях або в медичній практиці як ефективні лікувальні засоби. Наприклад, аміноптерин використовують для лікування лейкозу та пухлинних захворювань; ізоніазид (аналог вітаміну B₅) – туберкульозу; кумарини, що є антивітамінами нафтохінонів (вітаміни K), застосовують у лікуванні та профілактиці тромбозів.

Неконкурентне інгібування. Неконкурентний тип інгібування притаманний речовинам, які не мають структурної спорідненості (подібності) із субстратом і зв'язуються з каталітичними групами активного центра та ділянками, що розташовані поза активним центром (рис. 5.17). Таке приєднання інгібітору до ферменту змінює конфігурацію активного центра і пригнічує його взаємодію із субстратом. У цьому випадку утворюється потрійний комплекс: фермент – субстрат – інгібітор:



Цей комплекс не здатний продукувати продукт, тому реакція зупиняється.

До неконкурентних інгібіторів належать багато різних речовин, наприклад солі важких металів (срібла, ртуті, свинцю, кадмію, міді), сполуки арсенію, фосфорорганічні, алкілюючі речовини, йодацетат, ціаніди, оксид вуглецю, сірководень. Механізми дії кожного з названих інгібіторів різні. Наприклад, в основі інгібуючої дії солей важких металів лежить здатність їх блокувати SH-групи каталітичного центра ферментів; ціаніди міцно з'єднуються з Fe³⁺ каталітичного центра гемінового ферменту цитохромоксидази, що завершує процес біологічного

окиснення з утворенням води. Таке інгібування виключає дихальний ланцюг, і клітина гине. Йодацетат як інгібітор взаємодіє із SH-групами ферменту, утворюючи з ним ковалентну сполуку, що призводить до виключення ферменту. Оксид вуглецю CO є інгібітором переважно тих ферментів, у складі яких є залізо або мідь. Високу інгібуючу активність виявляють фосфорорганічні речовини. Серед них зустрічаються такі, що застосовуються в практичній медицині, сільському господарстві для боротьби зі шкідниками, а деякі – як бойові отруйні речовини (табун, зарин). Ці інгібітори утворюють із ферментами комплекси, які не мають каталітичної дії. Фосфорорганічні інгібітори гальмують дію протеаз (трипсину, хімотрипсину), естераз, зокрема ацетилхолінестерази, що каталізує розпад ацетилхоліну. Унаслідок дії фосфорорганічних інгібіторів буде нагромаджуватись ацетилхолін, що виявляється порушенням функції нервової системи.

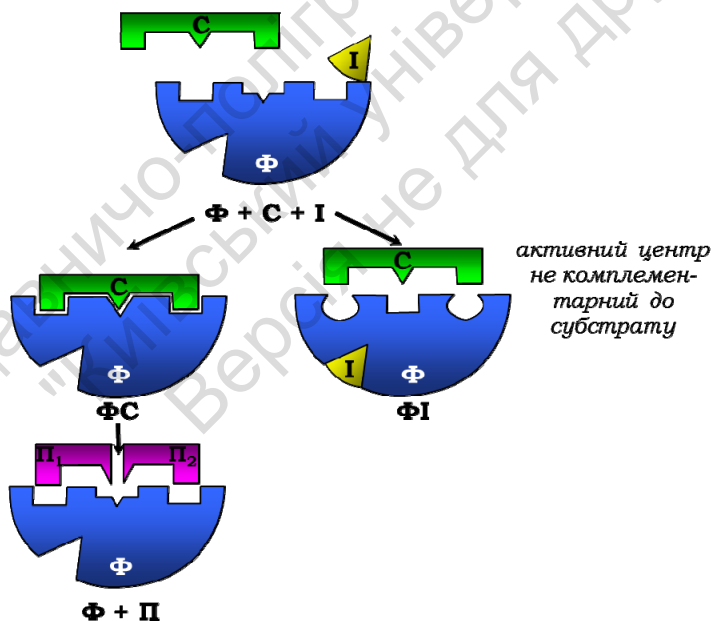
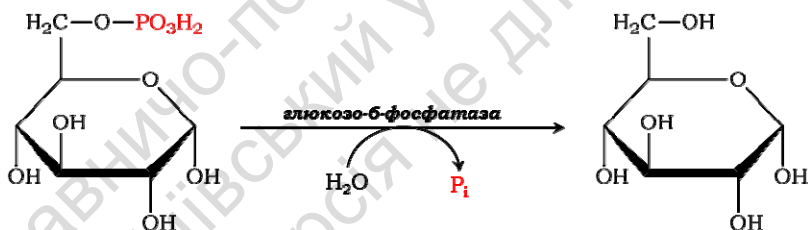


Рис. 5.17. Схема неконкурентного інгібування активності ферменту

Конкурентні та багато неконкурентних інгібіторів належать до зворотних чинників, оскільки вони утворюють із ферментами нестійкий комплекс, тобто гальмують реакції без значних змін у структурі ферменту. Ті інгібітори, що вступають у реакції з ферментами й утворюють з ними міцні сполуки за рахунок ковалентних зв'язків, викликають незворотне гальмування. Важливе місце серед неконкурентних зворотних інгібіторів посідають проміжні продукти метаболізму. Вони здатні зворотно зв'язуватися зі специфічними ділянками на поверхні деяких алостеричних ферментів і змінювати активність їхніх каталітичних центрів.

Інгібування продуктами реакції. Продукт реакції нерідко за структурою подібний до субстрату. Тому, нагромаджуючись, він може поводитися як конкурентний інгібітор ферменту. Цей процес може виконувати регуляторну функцію, оскільки нагромадження надлишку утвореного продукту призводить до гальмування його утворення. Наприклад, глюкоза є конкурентним інгібітором ферменту глюкозо-6-фосфатази:



Інгібування надлишком субстрату. Наявність в інкубаційному середовищі надмірно високих концентрацій субстрату викликає гальмування реакції. За цих умов крива Міхаеліса виявляє тенденцію до зниження. Зрозуміти таке інгібування можна, припустивши, що молекули субстрату через взаємні перешкоди здатні займати неправильні положення в активному центрі ферменту, що перешкоджає нормальному перебігу реакції.

Інгібування на генетичному рівні. Інгібування на генетичному рівні здійснюється шляхом пригнічення синтезу

білка-ферменту. Генетичне гальмування настає тоді, коли зникає потреба в певному ферменті. Наприклад, у процесі еволюції в людини зникли ферменти, які синтезують речовини, що містяться в достатній кількості в продуктах харчування: деякі амінокислоти, вітаміни С, В₁, В₂ тощо.

Отже, основними властивостями ферментів як біологічних каталізаторів є їхня висока активність, специфічність дії, термолабільність, залежність від рН середовища, наявності активаторів та інгібіторів. Перераховані властивості зумовлені білковою природою ферментів. Швидкість реакції залежить від співвідношення концентрації ферменту та субстрату.

Однією з характерних властивостей ферментів є їхня *термолабільність*, тобто чутливість до змін температури. Температура, за якої спостерігається максимальна швидкість ферментативної реакції, називається оптимальною. Для більшості ферментів її значення лежить у межах 35–40 °С. Із підвищенням температури білкова частина ферменту може денатурувати, і він втрачає здатність до каталізу. При зниженні температури середовища активність теж знижується.

Специфічність називається здатність ферментів каталізувати певні хімічні реакції. Розрізняють абсолютну, відносну, стереохімічну специфічність. Специфічність зумовлена білковою частиною ферментів, а також будовою їхніх активних центрів. Тільки деякі, чітко визначені, функціональні групи ферментів можуть брати участь в утворенні ферментосубстратних комплексів. Наприклад, амілаза прискорює гідроліз тільки полісахаридів (крохмалю, глікогену) і не діє на олігосахариди; мальтаза гідролізує розщеплення мальтози, але не діє на сахарозу.

Фермент виявляє максимальну активність за оптимального значення рН. Кожен фермент має своє оптимальне значення рН: пепсин – 1,5–2,5, аргіназа – 9,5, амілаза – 6,8–7,0. Зі зміною рН змінюється ступінь дисоціації іоногенних груп, фермент змінює конфігурацію, у тому числі активного центра, що зумовлює зниження або втрату його каталітичних властивостей.

Речовини, які підвищують активність ферментів, називаються *активаторами*, а ті, що пригнічують –

інгібіторами. Приклади активаторів деяких ферментів: для амілази – хлорид натрію, для ліпази – жовчні кислоти, для пепсину – соляна кислота. Неактивні форми деяких ферментів називаються *проферментами*. В організмі має місце аутоактивація – перетворення проферменту на фермент за допомогою того самого активного ферменту.

Наприклад, активний пепсин викликає аутокаталіз пепсиногену. Активатори та інгібітори (ефектори) можуть впливати безпосередньо на активний центр ферменту, а також взаємодіяти з алостеричними (регуляторними) центрами, тим самим змінюючи каталітичну активність ферменту. Інгібіторами можуть бути солі важких металів, ціаніди, фосфорорганічні сполуки, деякі продукти метаболізму, денатуруючі агенти та ін.

Класифікація та номенклатура ферментів. Існує два типи назв ферментів: *тривіальна* (робоча) і *систематична*.

Робоча назва ферменту складається з назви субстрату, назви типу каталітичної реакції та закінчення "*аза*". Наприклад, лактат + дегідрогенізація – *лактатдегідрогеназа*. Це фермент окиснення (дегідрогенізації) лактату.

За систематичною номенклатурою назва ферменту складається з назви субстрату, на який діє фермент, назви типу хімічної реакції та закінчення "*аза*". За цією номенклатурою назва лактатдегідрогенази пишеться так:

лактат : НАД – оксидоредуктаза (суб. I : суб. II – тип хім. реакції).

Поряд із цим зберігаються також назви давно відомих ферментів (історична назва), наприклад пепсин, хімотрипсин, каталаза тощо.

За офіційною міжнародною класифікацією ферменти поділяються на шість класів, залежно від типу каталізованих реакцій (табл. 5.2).

Класи ферментів поділяються на підкласи, а останні – на підпідкласи.

Підклас уточнює природу субстрату, на який діє фермент. Ще більше конкретизує дію ферменту підпідклас, оскільки вказує на природу другого субстрату чи акцептора, який бере участь у реакції.

Таблиця 5.2. Класифікація ферментів, реакції та приклади

Класи ферментів	Тип реакцій, які каталізують ферменти	Приклади ферментів
ОКСИДОРЕДУКТАЗИ	окисно-відновні реакції	лактатдегідрогеназа, сукцинатдегідрогеназа
ТРАНСФЕРАЗИ	перенесення функціональних груп між субстратами	аспартатамінотрансфераза, орнітинкарбамоїл трансфераза
ГІДРОЛАЗИ	реакції гідролізу	пепсин, ліпаза, сахараза
ЛАЗИ	негідролітичний неокисний розрив зв'язків, утворення/розрив подвійних зв'язків	альдолаза, аргінінсукцинатліаза
ІЗОМЕРАЗИ	реакції ізомеризації	ретинальізомераза, діоксиацетонфосфатізомераза
ЛІАЗИ (СИНТЕТАЗИ)	реакції синтезу за рахунок енергії АТФ	піруваткарбоксилаза, ацетил-КоА-карбоксилаза

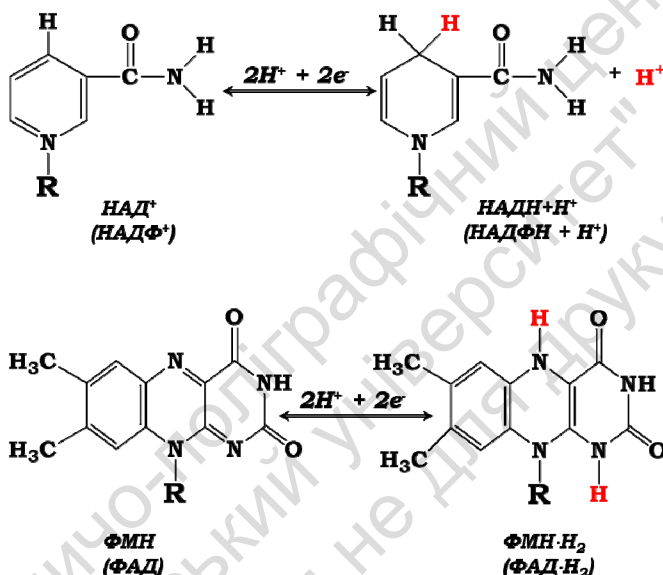
Згідно з класифікацією для кожного ферменту існує шифр, що містить чотири кодові числа, які розділяють крапками. Перша цифра шифру означає клас, друга – підклас, третя – підпідклас, четверта – порядковий номер ферменту в підкласі.

Наприклад, фермент цитохромоксидаза за міжнародною класифікацією має шифр 1.9.3.1, для лактатдегідрогенази шифр представлений цифрами 1.1.1.27.

Перший клас ферментів – оксидоредуктази. Це ферменти, що каталізують окисно-відновні процеси. *Окисненням називається процес віднімання електронів від елемента. Зворотний процес називається відновленням.*

Однак, оскільки окиснення одних речовин супроводжується відновленням інших, то всі ці перетворення об'єднуються під назвою *окисно-відновні процеси*. У живих організмах окиснення відбувається за допомогою відняття атомів водню

або електронів від субстратів (донаторів). Акцептором атомів водню або електронів можуть бути різні речовини – нікотинамідні коферменти (НАД, НАДФ), флавінові коферменти (ФМН, ФАД), іони металів, кисень, дисульфідні сполуки тощо. Будову коферментних форм нікотинамїду та рибофлавіну наведено нижче:



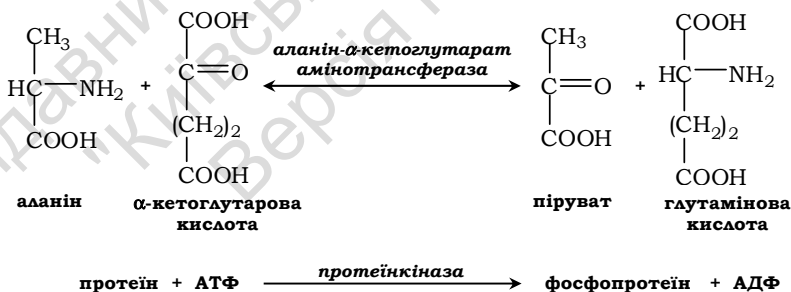
Оксидоредуктази поділяються на 17 підкласів. Цим ферментам належить дуже важлива роль у життєдіяльності організмів. Субстратами оксидоредуктаз можуть бути спирти, кислоти, альдегіди, кетони, NH₂-, NH-, SH-групи, гем і його похідні та ін. Назви цим ферментам даються за принципом: *донатор: акцептор-оксидоредуктаза*. Наприклад, фермент, що окиснює лактат до пірувату, називається *лактат: НАД-оксидоредуктазою*.

За тривіальною (робочою) номенклатурою оксидоредуктази, що відщеплюють атоми водню або електрони від субстрату

окиснення і передають їх на будь-який акцептор, крім кисню або перекису водню, називаються *дегідрогеназами*.

Оксидоредуктази, що використовують кисень як акцептор водню або електронів, називаються оксидазами; а ті з них, що переносять атоми водню на перекис водню – *пероксидазами*. Ті ферменти, яким властива більш відновна дія, називаються *редуктазами*. Частина ферментів класу оксидоредуктаз сприяють прямому включенню кисню в субстрат. Такі оксидази отримали назву *оксигеназ*, або *гідроксилаз*. Отже, у живому світі окиснення може відбуватися шляхом включення в субстрат атомів кисню або відщеплення електронів чи атомів водню.

Другий клас ферментів – трансферази. Каталізують реакції міжмолекулярного перенесення хімічних груп і залишків від одного субстрату (донор) до іншого (акцептор). Назва цих ферментів за міжнародною класифікацією будується так: донатор:акцептор – транспортвана група – трансфераза. Наприклад, фермент, який каталізує реакцію перенесення фосфорної групи з АТФ на гексозу – гексокіназа, а повна – АТФ:D-гексозо-6-фосфотрансфераза. Трансферази, залежно від виду переносуваних груп, поділяються на вісім підкласів. Ті, що переносять CH_3 -групи, називаються *метилтрансферазами*; переносники NH_2 -груп отримали назву *амінотрансфераз*.



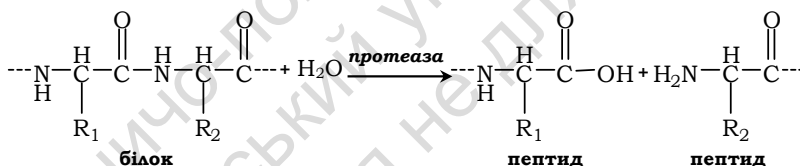
Розрізняють ще трансферази, що переносять залишки ацилів – *ацилтрансферази*; залишки карбоксильних груп – *карбокситрансферази*. Є також трансферази, що переносять

залишки альдегідів, кетонів тощо. Досить поширений підклас ферментів, що переносять залишки фосфорної кислоти на АДФ або від молекули АТФ на субстрат. Такі фосфотрансферази називають ще *фосфокіназами*.

За поширенням трансферази близькі до оксидоредуктаз. Вони беруть участь у реакціях взаємоперетворень різних речовин, знешкодженні природних і чужорідних сполук. Деякі трансферази використовуються в діагностиці захворювань. Наприклад, АЛАТ, АсАТ – для діагностики гострих гепатитів та інфаркту міокарда; креатинкіназа – для виявлення уражень скелетних м'язів.

Третій клас ферментів – гідролази. Це ферменти, що каталізують розрив зв'язків у субстратах із приєднанням H^+ та OH^- молекули води. Гідролаз нараховується до 460.

До гідролаз відносять травні ферменти (ліпази, протеази, глікозидази) і багато інших. Гідролази входять до складу лізосом та інших органоїдів, де сприяють розпаду біомакромолекул на прості речовини:



Четвертий клас ферментів – ліази. Каталізують відщеплення від субстрату негідролітичним шляхом якої-небудь групи з утворенням подвійного зв'язку або, навпаки, приєднання групи в місці подвійного зв'язку. Вони каталізують розрив зв'язків C–C, C–N, C–O, C–S. У зв'язку з цим розрізняють такі підкласи:

1) C–C-ліази. До них належать декарбоксилази. Під впливом декарбоксилаз відбувається декарбоксилювання амінокислот та α -кетокислот.

2) C–O-ліази, інша назва – гідролази, а за тривіальною номенклатурою – дегідратази (гідратази). Наприклад,

карбангідраза (карбонат-гідроліаза), яка розщеплює вугільну кислоту на CO_2 та H_2O , а також фумаратгідратаза, під впливом якої відбувається гідратація фумарової кислоти з утворенням яблучної.

3) С–N-ліази – ферменти, які відщеплюють аміак або амідінові групи. Наприклад, аргініносукциналаза розкладає аргінінбурштинову кислоту на фумарову й аргінін, що має місце під час утворення сечовини.

4) Альдолази – ферменти, що каталізують розрив гексозофосфатів на дві тріози. Наприклад, фруктозо-1,6-дифосфат розщеплюється на дві тріози – гліцеральдегід-3-фосфат і діоксіацетонмонофосфат.

П'ятий клас ферментів – ізомерази. Каталізують різноманітні процеси ізомеризації. В їхньому складі є кілька підкласів:

- рацемази, які каталізують перетворення L-амінокислот на D-амінокислоти;
- епімерази, які каталізують взаємне перетворення цукрів, наприклад галактози на глюкозу;
- мутази, які каталізують перенесення хімічних груп з однієї частини молекули в іншу.

Кофактором тут часто є похідне вітаміну B_{12} . Розрізняють ще цис-трансїзомерази, внутрішньомолекулярні оксидоредуктази, внутрішньомолекулярні трансферази.

Шостий клас ферментів – лігази. Каталізують процеси конденсації двох молекул за рахунок енергії АТФ (або ГТФ, УТФ). Зумовлюють утворення нових зв'язків, звідки й походить назва класу (від лат. *ligāre* – зв'язувати). Інша назва – *синтетази*, оскільки вони є каталізаторами біосинтетичних процесів.

У кожній клітині відбуваються тисячі різних хімічних реакцій, кожна з яких каталізує специфічний фермент. Клітина продукує енергію відповідно до метаболічних потреб, виробляє стільки мономерів, скільки їх необхідно для біосинтезу білків, нуклеїнових кислот, полісахаридів, тобто в нормі в клітинах і в усьому організмі немає нестачі чи надлишку

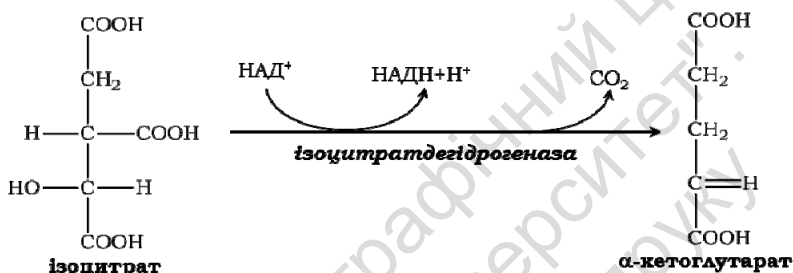
("перевиробництва") продуктів реакцій. У регуляції ферментативних процесів мають значення кілька механізмів.

Механізм саморегуляції ферментативних процесів базується на негативному або позитивному зворотному зв'язку. Механізм саморегуляції за принципом позитивного зворотного зв'язку виявляється у автокаталітичних і ланцюгових реакціях. Сюди належать перетворення проферментів на активні форми ферментів: пепсиноген – на пепсин, трипсиноген – на трипсин тощо.

Зустрічаються два типи інгібування: стеричне (конкурентне) й алостеричне. У першому випадку продукт реакції подібний до субстрату і може конкурувати з ним за активний центр, унаслідок чого реакція сповільнюється. В організмі більш поширені реакції, продукти яких не є подібними за структурою до субстрату. Тут інгібітор діє не на активний центр, а на його віддалену ділянку, що врешті призводить до деформації молекули ферменту, зокрема активного центра. Як наслідок фермент втрачає здатність приєднувати субстрат і реакція інгібується. Це вже інгібування алостеричне. Більшість регуляторних механізмів ґрунтуються на принципах зворотного негативного зв'язку. Прикладом регульованих систем можуть бути поліферментні системи, усі компоненти яких взаємозв'язані. Продукт реакції може впливати на ферменти клітин опосередковано – через клітинне ядро, яке містить систему синтезу ферментів (нуклеїнові кислоти).

Механізм регуляції ферментативних процесів за допомогою клітинних мембран, що регулюють надходження і видалення продуктів реакції. Цей тип регуляції пов'язаний із тим, що ферменти в клітині вмонтовані в мембрани або в певні місця клітини й переміщення речовин до місць їхнього знаходження регулюється: чим більше надходить субстрату крізь мембрани, тим більше утворюється продукту. Таким чином, регуляція метаболічних процесів здійснюється не тільки шляхом зміни активності ферментів, але й розподілом субстратів, метаболітів у різних ділянках клітини.

Регуляція ферментативних процесів за допомогою аденілатів (АТФ, АДФ, АМФ). Характерна для реакцій, пов'язаних з енергетичним обміном та утворенням АТФ. Якщо АТФ у клітині багато, то відбувається інгібування ферментів, які прискорюють його синтез (фосфофруктокіназа, ізоцитратдегідрогеназа, фумараза тощо). Коли концентрація АТФ у клітині низька, а отже, збільшена концентрація АДФ+АМФ, то це активує всі названі вище ферменти:



Регуляція шляхом модифікації ферменту. Одним з різновидів модифікації ферментів, як описано вище, є їх фосфорилювання/дефосфорилювання. В одних випадках фосфорилювання ферментів зумовлює підвищення їхньої активності, в інших – навпаки. Наприклад, у клітинах жирової тканини є фермент ліпаза, який може перебувати у двох формах – фосфорилюваній і нефосфорилюваній. Фосфорилювана ліпаза має значно вищу активність. Ключові ферменти енергетичного обміну – фосфорилаза та глікогенсинтетаза – також контролюються шляхом фосфорилювання і дефосфорилювання. Це здійснюється специфічними ферментами – протеїнкіназою та протеїнфосфатазою, рівень активності яких значною мірою визначають гормони.

Одним із прикладів вищеописаної регуляції є регуляція за допомогою аденілатциклазної системи (рис. 5.18). Важлива роль тут належить аденілатциклазі та протеїнкіназі А (ПКА), що утворюють єдину регуляторну систему (каскад реакцій), необхідну для передачі фізіологічного сигналу з позаклітинного середовища всередину клітини. При цьому утворюється цАМФ

як вторинний месенджер, який активує протеїнкінази. Протеїнкінази фосфорилують певні ферменти, що викликає зміну їхньої активності.

Знання тонких механізмів внутрішньоклітинної регуляції роботи ферментів є надзвичайно важливим для забезпечення ефективного використання очищених ферментів *in vitro*.

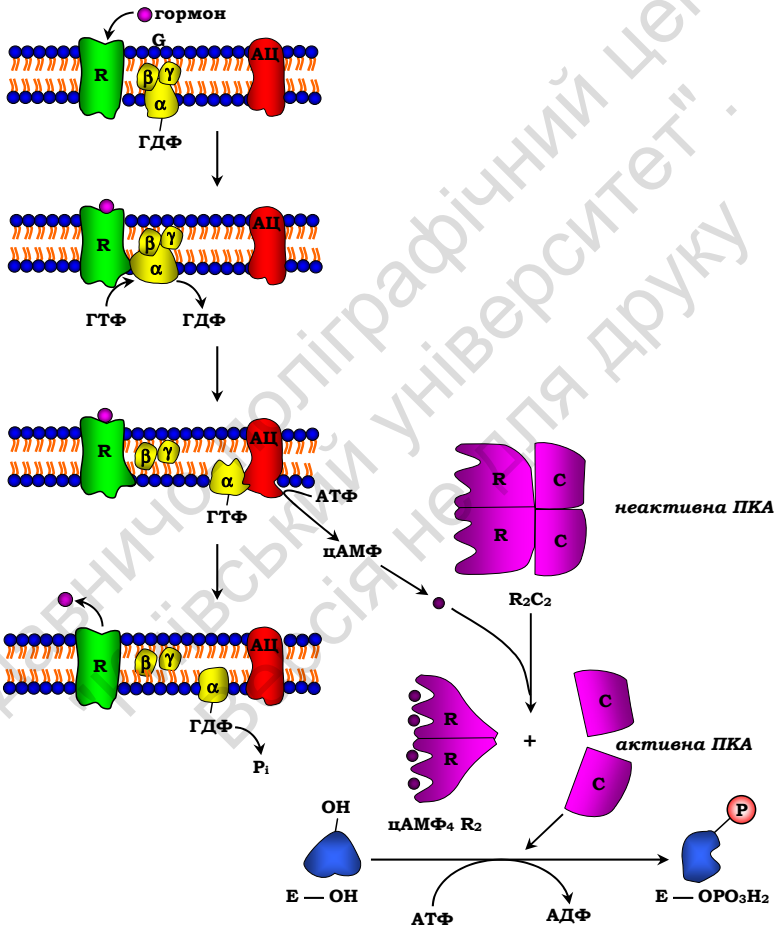


Рис. 5.18. Аденілатциклазна система:

R – рецептор, α , β , γ – протомери G-білка;
АЦ – аденілатциклаза, ПКА – протейніназа А

Способи вираження активності ферментів. У біологічних об'єктах ферменти представлені в мізерних кількостях, тому для характеристики ферментативних процесів визначають не вміст ферментів, що пов'язано з великими труднощами з огляду на їхню білкову природу, а швидкість каталізованої ними реакції. Швидкість ферментативної реакції залежить як від активності, так і від кількості ферменту. Дослідження проводять в умовах оптимальної температури (25 °C), рН середовища і повного насичення ферменту субстратом. Швидкість ферментативної реакції оцінюють за кількістю розщепленого субстрату або утвореного продукту реакції. Існує кілька одиниць для вираження активності ферментів, зокрема, за міжнародну одиницю (МО) активності ферменту приймається така його кількість, що перетворює один мікромоль субстрату (мкмоль) за одну хвилину в стандартних умовах (МО = мкмоль/хв). Іншою загальновизнаною одиницею активності ферменту є катал (кат). Він відповідає кількості ферменту, що перетворює 1 моль субстрату на продукт за 1 с (кат = моль/с). Відношення міжнародної одиниці (МО) до каталу виражається таким чином:

$$\begin{aligned} 1 \text{ кат} &= 1 \text{ моль} \times \text{с}^{-1} = 60 \text{ моль} \times \text{хв}^{-1} \\ &= 60 \times 10^6 \text{ мкмоль} \times \text{хв}^{-1} = 6 \times 10^7 \text{ МО}, \end{aligned}$$

або

$$\begin{aligned} \text{МО} &= 1 \text{ мкмоль} \times \text{хв}^{-1} = 1/60 \text{ мкмоль} \times \text{с}^{-1} \\ &= 1/60 \text{ мккат} = 16,67 \text{ нкат}. \end{aligned}$$

Також активність ферментів виражають через питому та молекулярну активності. Питома активність ферменту виражається кількістю одиниць ферментативної активності, що припадає на 1 мг білка. Чим вища питома активність, тим чистіший виділений фермент. Кількість молекул субстрату, що перетворюється однією молекулою ферменту за хвилину, називають *числом обертів*, або *молекулярною активністю*

ферменту. Наприклад, одна молекула каталази еритроцитів здатна розщепити за 1 хв 5×10^6 молекул перекису водню.

В основі багатьох захворювань лежать порушення нормального функціонування ферментативів. Зміни в перебігу специфічних ферментативних реакцій можна кваліфікувати як причину або наслідок різних патологічних станів.

Більшість ферментів, що каталізують хімічні реакції, містяться в клітинах. Проте на основі результатів аналізів позаклітинних рідин (плазми, сироватки крові, сечі та ін.) можна зробити висновок про зміни, що відбуваються всередині клітин різних органів і тканин.

Кількість ферменту визначають за його дією на субстрат і називають активністю. Про активність ферментів свідчать такі критерії:

- кількість субстрату, перетвореного в одиницю часу за постійних умов;
- кількість кінцевих продуктів реакції, що утворилися в одиницю часу за постійних умов;
- час, необхідний для перетворення певної кількості субстрату за постійних умов.

Для цього використовують різні методи дослідження: спектрофотометричні, полярографічні, манометричні, хроматографічні та ін. Активність ферментів вимірюється у вищеписаних одиницях питомої активності.

Запитання для самоконтролю

1. Що таке кінетика ферментативного каталізу?
2. За яких концентрацій субстрату досліджують кінетику ферментів? Чому?
3. Наведіть приклади модуляторів ферментів.
4. Які іони металів служать ефекторами ензимів?
5. Поясніть явище автокаталізу.
6. Опишіть механізми, що лежать в основі активації ферментів.
7. Наведіть приклад неспецифічного незворотного інгібітору ферментів.

8. Як ще називають ізостеричне інгібування? Поясніть його механізм.
9. Поясніть, що таке антивітаміни.
10. Яким чином відбувається інгібування ензимів у фізіологічних умовах?
11. Скільки класів ферментів виділяють за сучасною класифікацією?
12. Скільки цифр у коді ферменту? Поясніть, що вони означають.
13. Поясніть механізм окисно-відновних реакцій.
14. Які речовини є кофакторами оксидоредуктаз?
15. До якого класу належать ферменти оксигенази?
16. Наведіть приклади гідролаз і ліаз.
17. До якого класу належать ферменти мутази?
18. Поясніть різницю між стеричним і алостеричним інгібуванням.
19. Які механізми регуляції ферментативної активності вам відомі?
20. Які способи вираження активності ферментів вам відомі?
21. Який спосіб вираження активності є найпростішим у практичному застосуванні?
22. Наведіть приклад патології, пов'язаної зі зміною активності певного ферменту.

5.3. Інженерна ензимологія

Інженерна ензимологія, поряд з генетичною та клітинною інженерією, становить фундамент нової біотехнології.

Інженерна ензимологія – це галузь біотехнології, яка базується на використанні каталітичних функцій ферментів (або ферментних систем) в ізольованому стані або у складі певних клітин для одержання відповідних цільових продуктів. Слово "інженерна" свідчить про створення конструкції (від франц. *engin* – машина), у даному випадку – конструювання біокаталізаторів із заданими властивостями з подальшим використанням у біотехнологічному процесі. Це новий науково-

технічний напрям, який ґрунтується на хімічній ензимології, біохімії, хімічній технології та інженерно-економічних дисциплінах. Основне завдання інженерної ензимології – розробка біотехнологічних процесів, у яких використовується каталітична дія ферментів, виділених зі складу біологічних систем, або ферментів, які містяться в клітинах, штучно позбавлених здатності до росту. Існує також інше означення завдання інженерної ензимології: це конструювання біоорганічних каталізаторів із передбаченими властивостями на основі ферментів або поліферментних комплексів, виділених із біологічних систем, які розвиваються. З огляду на практичні потреби одержання певних продуктів передбачені властивості – це визначений термін служби каталізатора за певних умов (температури, рН, іонної сили розчину), його селективність (специфічність) дії, продуктивність (активність), імуногенність, токсичність тощо.

Однак завдання інженерної ензимології набагато ширші, ніж створення каталізаторів нового типу. Найголовніша мета цієї галузі – розробка наукових основ використання ферментних каталізаторів для створення нових біотехнологічних процесів у промисловості, нових методів у терапії та діагностиці, аналізі, органічному синтезі та інших галузях практичної діяльності.

Завдяки високій активності та специфічності деякі ферменти й ферментні системи застосовують як біокаталізатори в різних сферах практичної діяльності: харчовій, фармацевтичній, текстильній, шкіряній та інших галузях промисловості, ветеринарній медицині, сільському господарстві, органічному синтезі, хімічному аналізі тощо. У промисловості, наприклад, використовуються переважно препарати для гідролізу природних полімерів білків, крохмалю, пектинів (табл. 5.3).

Однак ширше технологічне використання розчинних (нативних) ферментів ускладнюється через причини, зумовлені їхньою білковою природою. Перш за все, ферменти можуть функціонувати лише за певних умов: рН середовища, температури, іонної сили розчину, відсутності інгібіторів. Також вони чутливі до зберігання та впливу різних факторів,

особливо теплових. Складність роботи з ферментами також пов'язана зі зменшенням їхньої активності при відокремленні їх від продуктів реакції.

Подолати вищезазначені труднощі значною мірою вдалося шляхом іммобілізації ферментів, тобто переведення їх із розчинної в нерозчинну форму.

Таблиця 5.3. Ферменти, що використовуються в промисловості

	Ферменти	Сфера застосування
1.	α -амілаза	гідроліз крохмалю, обробка текстильних виробів
2.	Бромелайн	виробництво поживних сумішей на основі гідролізу білків, розм'якшення м'яса
3.	Глюкоізомераза	виробництво глюкозо-фруктозних сиропів
4.	Глюкоамілаза	одержання глюкози, оцукрення пива
5.	Глюкооксидаза	видалення кисню з харчових продуктів
6.	Інвертаза	виробництво кондитерських виробів
7.	Каталаза	видалення перекису водню після стерилізації молочних продуктів
8.	Ліпази	модифікація смаку молочних продуктів
9.	Папаїн	освітлення пива, розм'якшення м'яса
10.	Пектиназа	освітлення вин і фруктових соків
11.	Ренін	вироблення сирів
12.	Трипсин	вичинка шкір
13.	Целюлаза	обробка соломи

Промислові ферментні препарати. Як видно з наведеної вище таблиці, у сучасних промислових технологічних процесах велике значення мають гідролітичні ферменти. Однією із суттєвих переваг порівняно з іншими класами ферментів є їхня здатність здійснювати ферментативні реакції без кофакторів і коферментів. У багатьох виробництвах гідролази замінили процес кислотного гідролізу. Їхня висока специфічність дає змогу одержувати готові продукти з мінімальною кількістю сторонніх речовин без зміни вихідних смаку й аромату.

Найчастіше використовуються такі групи ферментів:

Амілолітичні ензими – α -амілаза і глюкоамілаза. Субстратом для них є крохмаль. Амілаза розщеплює крохмаль до простіших поліцукрів – декстринів, а глюкоамілаза – декстрини та крохмаль до глюкози. Ці ферменти використовують у харчовій, спиртовій промисловості та тваринництві.

Протеолітичні ферменти утворюють групу пептидгідролаз (протеаз). Їхня дія полягає у прискоренні гідролізу пептидних зв'язків у білках і пептидах. Важлива їхня особливість – вибіркова, селективна дія на пептидні зв'язки в білковій молекулі. Наприклад, пепсин діє тільки на зв'язок, утворений ароматичними амінокислотами, трипсин – тільки на зв'язок з аргініном чи лізином.

Ферментів цього класу дуже багато. У промисловості їх класифікують за здатністю виявляти активність у певних межах рН: 1,5–3,7 – кислі протеази; 6,5–7,5 – нейтральні протеази; до 8,0 – лужні протеази.

Використання протеаз широке: м'ясна промисловість – для розм'якшення м'яса; шкіряна промисловість – при видаленні шерсті (волосся) і розм'якшенні шкір; парфумерія – домішки до зубної пасти, креми, лосьйони; промислові синтетичні миючі засоби; медицина – для лікування запальних процесів, опіків, тромбозів; тваринництво – домішки до раціонів сільськогосподарських тварин.

Пектинолітичні ферменти (пектинази) – гідролізують пектинові речовини з утворенням органічних кислот. Використовуються: у текстильній промисловості – вимочування льону перед переробкою; у виноробстві – освітлення вин; у консервуванні – для виготовлення фруктових соків; у тваринництві – домішки до раціонів тварин для поліпшення перетравлення поживних речовин.

Целюлолітичні ферменти (целюлази) – дуже специфічні, їхня дія виявляється тільки в деполімеризації молекул целюлози. Зазвичай вони діють у вигляді комплексу, який загалом доводить гідроліз целюлози до глюкози. Їх використання дуже перспективне: у гідролізній промисловості – це отримання глюкози з целюлози; у медицині – виділення лікарських речовин (стероїдів) із рослин; у харчовій промисловості – поліпшення

якості рослинних олій; у сільському господарстві – домішки до комбікормів для жуйних тварин.

Біотехнологія отримання ферментів. У сучасній біотехнології одне з провідних місць належить ферментам. Усе живе їх містить, без них неможливий обмін речовин. Препаративне отримання ферментів дозволяє суттєво змінити технологічні процеси, методи аналізів, забезпечити вищі показники й виходи у промисловості та сільському господарстві, упровадити принципово нові методи наукових досліджень.

Одержання ферментів та їх використання в різних технологічних процесах є одним з найважливіших розділів сучасної біотехнології. Процес напрацювання ензимів включає всі описані в попередніх розділах методи та підходи.

На сьогодні промисловість випускає понад 20 індивідуальних ферментів і майже 40 ферментативних технічних препаратів, тобто сумішей, які містять, крім цільового ферменту, значну кількість близьких за фізико-хімічними властивостями білків. Для відокремлення цих білків часто застосовують трудомісткі й дорогі хроматографічні методи, що різко підвищує вартість кінцевого продукту. Тому чисті ферменти використовують переважно в медицині та наукових дослідженнях, а в промислових процесах – зазвичай ферментні препарати.

Джерелом ферментів є тканини тварин, рослин і мікроорганізмів. Хоча деякі тканини тварин, наприклад підшлункова залоза, слизова оболонка шлунка багаті ферментами, широкомасштабне виробництво ферментів тваринного, а також рослинного походження неможливе через обмеження сировинних ресурсів. Крім цього, тканини тварин і рослин дуже вимогливі до умов культивування, що значно підвищує вартість виробництва ферментів.

Найбільш доступним і практично необмеженим джерелом одержання ферментів у промислових умовах є мікроорганізми: прокаріоти (бактерії, актиноміцети, рикетсії) і частина еукаріотів (дріжджі, нитчасті гриби, водорості). У них містяться ферменти

всіх відомих типів, а методи сучасної мікробіології дозволяють отримувати їх за короткий час.

Мікробіологічне отримання ферментів має такі переваги над тканинним:

1) Мікроорганізми дуже швидко розмножуються, у деяких із них ділення відбувається щогодини або навіть кожні десять хвилин, а отже, з невеликої первинної кількості бактерій за кілька днів можна одержати значну мікробну біомасу. Такі темпи абсолютно недосяжні для рослин і тварин.

2) Ріст і розмноження відбуваються при застосуванні простих і дешевих поживних середовищ, які найчастіше є відходами інших виробництв. Як джерело вуглецю мікроорганізми можуть використовувати вуглеводи, спирти, карбонові кислоти. Джерелами азоту можуть бути органічні (білки, пептиди, амінокислоти) і мінеральні речовини (солі амонію, аміак), а також атмосферний азот. У промислових сферах як джерела органічного вуглецю й азоту найчастіше використовують різні сорти крохмалю (кукурудзяний, картопляний, рисовий), кукурудзяний екстракт, соєву муку, гідролізати біомаси дріжджів тощо. Потреба мікроорганізмів у макро- й мікроелементах задовольняється за рахунок солей неорганічних кислот.

3) Кожен мікроорганізм містить великий набір ферментів. Це сприяє тому, що один вид мікроорганізмів можна використовувати як продуцент для одержання різних ферментів.

Швидкість біосинтезу ферментів мікроорганізмами досить висока і часто керована. Продуктивність штамів-продуцентів можна збільшити у 2–5 разів за допомогою селекції, підбором умов культивування й одержання високопродуктивних мутантних форм мікроорганізмів. Використовуючи біотехнології рекомбінантних ДНК, можна отримати штами мікроорганізмів, у яких вміст ферментів досягає 50 % загальної маси синтезованого білка. Вищезазначене дає можливість різко збільшити виробництво ферментних препаратів і знизити вартість ферментів приблизно у 100–1000 разів.

Більшість ферментів, які синтезуються мікроорганізмами, є екстрацелюлярними продуктами й виділяються в рідке

середовище існування клітин. Це позаклітинні ферменти. Інколи ж ферменти не виділяються в оточуюче середовище або зв'язані з клітинними органелами (внутрішньоклітинні ферменти). Позаклітинні ферменти є переважно гідролазами.

Виділення ферментів здійснюється із застосуванням комплексу прийомів, які дають змогу отримувати ферментні препарати, придатні для використання в наукових дослідженнях, медицині та біотехнології.

Виділення ферментів залежить від того, чи накопичується продукт у клітині (внутрішньоклітинні ферменти) або він виділяється в культуральну рідину (позаклітинні ферменти); у деяких випадках продуктом є сама клітинна маса. Найскладніше виділити фермент (продукт), який накопичується в клітинах або зв'язаний клітинними органелами. Для цього клітини необхідно відокремити від культуральної рідини та зруйнувати (дезінтегрувати) їхні оболонки.

Культура мікроорганізмів, вирощена поверхневим методом, і культуральна рідина після глибокого культивування містять велику кількість баластних речовин: біомасу продуцента, невикористані компоненти поживного середовища, продукти метаболізму. Частка ферментів становить майже 1 % для поверхневих і не більше 0,1 % – для глибоких культур.

Часто для подальшого використання ферментів їх потрібно виділити й очистити, що є трудомістким і вартісним процесом.

Виділення позаклітинних ферментів. Позаклітинні ферменти одержують із культуральної рідини після сепарації, тобто після розділення культуральної рідини та біомаси мікробних білків. Інколи сепарації передують спеціальна обробка культури – зміна рН, нагрівання, додавання коагулянтів білків для ефективнішого відокремлення біомаси та стабілізації продуктів. Існують різні методи сепарації:

1) *Флотація* може бути використана, якщо клітини продуцента в біореакторі накопичуються в поверхневих шарах рідини. Флотатори різних конструкцій зціджують, відкачують або знімають піну, яка містить мікробні клітини.

2) *Фільтрація* – затримання біомаси на пористій фільтруючій поверхні.

3) *Центрифугування* – осаджування часток, які перебувають у завислому стані в рідині, з використанням відцентрової сили.

Виділення внутрішньоклітинних ферментів. Внутрішньоклітинні ферменти виділяють після руйнування (дезінтеграції) клітин. Для руйнування клітин застосовують:

1) *механічні методи* – балістичний, екструзійний і декомпресійний;

2) *фізичні методи* – осмотичний, термошок, плазмоліз, заморожування/відтаювання, висушування клітин, ультразвук, іонізуюча радіація;

3) *хімічні методи* – дія кислот, лугів, солей органічних розчинників, поверхнево-активних речовин;

4) *ензиматичні методи* – дія лізоциму та інших літичних ферментів;

5) *біологічні методи* – інгібування біосинтезу клітинної оболонки, дія фагів, одержання мутантних форм мікроорганізмів-продуцентів ферментів із легкоруйнівними стінками.

Фізичні способи дезінтеграції більш економічні, ніж хімічні й біолого-ензиматичні, оскільки не використовують дорогі реактиви та ферментні препарати. Однак вони можуть негативно впливати на якість продукту. Перспективним для дезінтеграції мікроорганізмів-продуцентів вважається використання іммобілізованих ферментів.

Очищення ферментних препаратів. У деяких випадках ферментні препарати використовують у неочищеному вигляді: у шкіряній і спиртовій промисловості ступінь очищення не впливає на якість готової продукції, а у тваринництві введення біомаси продуцента і домішок в корми навіть підвищує їх поживну цінність. Натомість у харчовій і мікробіологічній промисловості, медицині можуть використовуватися тільки достатньо очищені й навіть високоочищені ферменти.

Методи, що дають змогу одержувати ферментні препарати необхідного ступеня чистоти:

1) *Метод розділення*, який базується на неоднаковій розчинності білків. Розділення найчастіше проводять шляхом осаджування білків-ферментів без втрати їхньої каталітичної активності. Осаджувати розчинні ферменти можна фізичними або хімічними впливами. Фізичні – нагрівання, охолодження, розбавлення або концентрування розчину. Із хімічних речовин для осаджування використовують солі неорганічних кислот, частіше – сульфат амонію, а також органічні розчинники (етанол, ацетон, діоксан, поліетиленгліколь, декстран).

2) *Хроматографія* (адсорбційна, гідрофобна, афінна, іонообмінна та гель-фільтрація), яка проводиться на гелях агарози, поліакриламиду, фосфату кальцію, а також на оксиді алюмінію, силікагелі, крохмалі, целюлозі тощо.

3) *Зонально-швидкісне центрифугування* в градієнті щільності (сахарози, гліцерину, декстрану, глікогену, білків тощо).

4) *Електрофорез* – коли розчин ферменту поміщають у сильне електричне поле, яке приводить у рух його іонізовані компоненти.

5) *Ізоелектрофокусування* – фермент фокусується в зоні, величина рН якої дорівнює його ізоелектричній точці.

З перелічених методів розділення й очищення ферментів лише деякі (іонообмінна й афінна хроматографія) упроваджені у великомасштабне виробництво. Перспективним для очищення ферментів є застосування водних двофазових систем, що містять полімери, які стабілізують фермент, що дає змогу не застосовувати низькі температури.

Концентрування ферментів. На цій стадії відбувається остаточне виділення вологи з продукту. Концентрування розбавлених білкових розчинів, як описано вище, здійснюється такими методами:

1) *ультрафільтрацією* – фільтрацією під тиском крізь мембрани, які діють за принципом молекулярного сита;

2) *випарюванням під вакуумом*;

3) *ліофільним сушінням* – висушуванням за низьких температур під вакуумом;

4) *осаджуванням сульфатом амонію*.

Після концентрування препарат має містити не більше 6–8 % води. У цьому випадку термін його зберігання без втрати каталітичної активності становить один рік. У процесі виділення й очищення фермент може інактивуватись, тому всі процеси проводяться за низьких температур і за присутності різних стабілізуючих агентів: субстратів, кофакторів, комплексоутворювачів, відновлюючих агентів.

Стандартизація ферментних препаратів. Стандартизацією називають операцію з доведення активності препарату до стандартної, яка визначена Державними стандартами (ДСТ) або технічними умовами. Для цього використовують різні нейтральні наповнювачі, найчастіше крохмаль, лактозу, харчову сіль. Препарат і наповнювач ретельно перемішують.

Оскільки ферменти є речовинами білкової природи, то в суміші з іншими білками визначити їхню кількість практично неможливо. Наявність ферменту в препараті може бути встановлена лише за перебігом тієї реакції, яку каталізує фермент. Кількісну характеристику наявності ферменту можна дати за кількістю утворених продуктів реакції або витраченого субстрату за стандартних умов перебігу реакції (температури, рН середовища, концентрації субстрату тощо). За рішенням Міжнародного біохімічного союзу була прийнята *стандартна одиниця активності* (Е) – це кількість ферменту, яка каталізує перетворення 1 мкмоль субстрату за 1 хв за заданих стандартних умов.

Активність ферментного препарату виражається в мікромолях субстрату, який прореагував під дією 1 мл ферментного розчину або 1 г препарату в оптимальних умовах за 1 хв. Якщо ферментний препарат не містить баласту, то його активність виражається в тих самих стандартних одиницях на 1 мг ферменту. Якщо ж баласт є, то активність розраховується на 1 мг білка у ферментному препараті. Активність ферментного препарату, який випускає завод, є одним з найважливіших нормованих показників його якості.

Ідентифікація та індексація ферментних препаратів. Для ідентифікації ферментних препаратів, які випускаються

мікробіологічною промисловістю, використовують цифрову та літерну індексацію: Пх; ПЗх; П5х; П10х; П15х; П20х та Гх; ГЗх; Г5х; Г10х; Г15х; Г20х. Перші літери "П" або "Г" указують на спосіб культивування продуцента – поверхневий або глибинний. Наявність ферменту в препараті позначається літерою "Х". Наступні за літерами "П" або "Г" цифри показують ступінь очищення ферменту в процесі його отримання – чим вище очищення, тим більше число.

Пх або Гх – це технічні ферментні препарати, які містять 1–5 % цільового ферменту від маси білка, що синтезується, і велику кількість зайвих речовин: біомасу продуцента, компоненти поживного середовища, продукти метаболізму.

Запитання для самоконтролю

1. Поясніть, що таке інженерна ензимологія.
2. Які завдання має розв'язувати інженерна ензимологія?
3. Який клас ферментів набув найбільшого промислового поширення? Чому?
4. Поясніть, чим відрізняються пектинази від протеаз.
5. Що таке целюлази?
6. Які вимоги висувають до "ідеальних" джерел ферментів для їх виділення?
7. Порівняйте рослини, тваринні тканини та мікроорганізми як продуценти ферментів.
8. Який тип культивування, поверхневий чи глибинний, ефективніший при виробництві ензимів?
9. Які способи руйнування клітин-продуцентів вам відомі? Порівняйте їх.
10. Поясніть, на якому етапі отримання ферментів застосовується електрофорез та ізоелектрофокусування і чим вони різняться.
11. Що лежить в основі визначення активності ферментів?
12. Поясніть літерну індексацію ферментів Пх та Гх.

5.4. Імобілізовані ферменти як інструмент біотехнології

Ферменти виявляють активність не тільки в мікрооточенні клітини, але й поза організмом. Вони є дуже активними та специфічними каталізаторами і прискорюють багато реакцій, для яких наразі не відомі хімічні каталізatori. Тому практичне використання ферментів відкриває величезні можливості для розробки багатьох хімічних процесів, які відбуваються у м'яких умовах з високим виходом цільових продуктів. Однак, по-перше, ферменти, ідеально пристосовані для роботи в живій клітині, у разі вилучення зі свого оточення стають дуже нестійкими й не можуть функціонувати тривалий час. По-друге, ферменти зазвичай є гомогенними каталізаторами, що дуже незручно з технологічного погляду, оскільки такий каталізатор важко відокремити від продуктів реакції й використати знову. По-третє, деякі хіміко-технологічні процеси бажано проводити за підвищеної температури, наприклад для того, щоб не допустити забруднення продуктів синтезу (особливо лікарських препаратів) мікрофлорою; проте з підвищенням температури стабільність ферментів катастрофічно знижується. Крім того, дуже часто органічні речовини можна одержувати з високим виходом лише в тому випадку, коли реакція перебігає виключно в середовищі органічного розчинника. Однак у таких умовах звичайні ферменти не здатні нормально працювати і швидко втрачають каталітичну активність. З цього випливає, що фермент, виділений із живої клітини, потребує певного вдосконалення для його ефективного застосування.

За останні 15–20 років вищеописані обмеження вдалося подолати, і ферменти стали повноправними компонентами технологічних схем виробництва. Це було досягнуто шляхом розвитку методів імобілізації ферментів.

Імобілізований фермент (лат. *immobilis* – нерухомий) – це фермент, приєднаний тим чи іншим способом до інертної, нерозчинної основи або носія (матриці) із частковим або повним збереженням його каталітичної активності.

Імобілізованим вважають також фермент, розміщений у сіткоподібній матриці, крізь яку вільно проникають низькомолекулярні субстрати і продукти ферментної реакції, але не можуть вийти макромолекули білка-ферменту.

При іммобілізації обмежується рухливість молекул і відбувається закріплення структури таким чином, що активний центр ферменту зберігає каталітичну активність протягом тривалого часу.

Метою іммобілізації є можливість використання ферментних препаратів як промислових каталізаторів у біотехнологічних процесах одержання продукції, для аналітичної роботи й у лікувальних цілях.

Під іммобілізацією розуміють таку процедуру, унаслідок якої молекула ферменту тим чи іншим способом прикріплюється до певних об'єктів (носіїв), нерозчинних у воді. Ці об'єкти разом із ферментом легко відокремлюються від розчину після завершення реакції. Хімічне "пришивання" ферменту до носія стабілізує конформацію ферменту, що є причиною підвищення стійкості та зниження лабільності.

Приблизно у 70-х рр. XX ст. на стику хімічних і біологічних дисциплін сформувався новий науково-інженерний напрям – інженерна ензимологія (один з найважливіших розділів біотехнології), стрімкий розвиток якої зумовив створення нових типів гетерогенних біоорганічних каталізаторів – іммобілізованих ферментів.

Ферменти й ферментні системи традиційно застосовуються в найрізноманітніших галузях практичної діяльності: харчовій, фармацевтичній, текстильній, хутровій, шкіряній тощо; медицині, сільському господарстві, органічному синтезі, хімічному аналізі. Останніми роками ферменти стали застосовувати для здійснення таких реакцій органічної хімії, як окиснення, відновлення, метилювання, ацетилювання, дезамінування, декарбоксилювання, дегідратація, конденсація для поділу і відокремлення ізомерів тощо. Уже зараз стало очевидним, що застосування біокаталізу в тонкому органічному синтезі відкриває шлях до безвідходних і низькотемпературних

процесів, які перебігають до того ж у неагресивних середовищах. Немає сумнівів, що впровадження біокаталітичних процесів у хімічну технологію неминуче сприятиме економії сировини та енергії, зменшенню шкоди, якої сучасна промисловість завдає навколишньому середовищу. Оволодіння тонкими механізмами дії ферментів надасть необмежені можливості одержання у значних кількостях і з великою швидкістю корисних речовин у лабораторних і заводських умовах майже зі 100 %-м виходом.

Перспективи широкого застосування ферментів сприяють налагодженню їх промислового одержання у великих кількостях. Сировиною для цього служать тканини різних рослин і тварин, але найчастіше – мікроорганізми, які вирощують на селективних середовищах. Крім того, мікроорганізми швидко накопичують біомасу, тому для їх культивування можуть бути використані дешеві поживні середовища. Наприклад, методами селекції, мутагенезу та генної інженерії вдалося одержати штами різноманітних видів бактерій, що продукують ті чи інші ферменти в значних кількостях, іноді з виходом понад 50 % від загальної маси клітинного білка.

Таким чином, іммобілізовані ферменти – це штучно одержаний комплекс ферменту з нерозчинним у воді носієм. Однак поняття "іммобілізація" необхідно розуміти ширше, тобто як будь-яке обмеження свободи руху білкової молекули ферменту в просторі. Крім зв'язування з нерозчинним носієм, цього можна також досягти, наприклад, шляхом внутрішньомолекулярної або міжмолекулярної "зшивки" білкових молекул ферменту низькомолекулярними біфункціональними реагентами або ж приєднанням ферменту до розчинного полімеру.

Іммобілізація здійснюється фізичними та хімічними методами: 1) шляхом фізичної адсорбції ферментів на нерозчинному матеріалі; 2) включенням ферментів до комірок гелю, а також 3) ковалентним зв'язуванням ферменту з нерозчинним матеріалом або молекул ферменту між собою з

утворенням нерозчинних поліферментних комплексів. Як адсорбенти використовують скло, силікагель, гідроксипатити, целюлозу та її похідні, хітин, декстрини та ін. Для включення ферменту до комірок гелю використовують різноманітний гелеутворюючий матеріал, найчастіше поліакриламідний гель. Як матеріал для ковалентного зв'язування ферментів застосовують поліпептиди, білки, похідні стиролу, поліакриламід, нейлон, різні похідні целюлози, крохмаль, агар, агарозу, а також скло, силікагель тощо. При ковалентному зв'язуванні ферменти містяться на хімічному "повідку" біля нерозчинного носія.

При іммобілізації ферментів використовують принципи, подібні до тих, що застосовують у афінній хроматографії. Афінна хроматографія ґрунтується на біоспецифічній взаємодії біополімеру, що виділяється, або групи полімерів із певною речовиною. Цей вид хроматографії застосовується до ферментів, імуноглобулінів, рецепторних білків, які здатні вибірково за типом комплементарності зв'язуватися із субстратами, рецепторами, антигенами, інгібіторами, кофакторами тощо. Принцип цього методу хроматографії полягає в тому, що на нерозчинному носії закріплюють речовину, здатну специфічно зв'язуватися з білком, який виділяється, зокрема ферментом. Таку речовину називають *лігандом*. Оброблений таким чином носій (адсорбент) розміщують у колонці, крізь яку пропускають суміш білків. З адсорбентом зв'язується тільки той білок, який має спорідненість зі специфічним лігандом. Потім білок знімають із колонки розчином, що викликає дисоціацію комплексу, який утворився між білком і лігандом.

Під час одержання іммобілізованих ферментів уживають усіх запобіжних заходів для збереження нативної форми й активності ферменту. Іммобілізовані ферменти зазвичай менш активні, ніж вільні, оскільки зв'язування з носієм послаблює індукційний ефект і контакт із субстратом.

Імобілізовані ферментні препарати мають низку суттєвих переваг при використанні їх із прикладною метою порівняно з нативними попередниками:

1) При імобілізації ферменти від гомогенних каталізаторів (які перебувають у тій самій фазі, що й субстрати реакції) переходять у гетерогенні (які утворюють особливу фазу, відділену від реагентів). Фермент і реагенти завдяки цьому можуть бути розділені. Це дає можливість:

- зупинити в будь-який момент реакцію;
- регенерувати фермент після закінчення реакції й використати каталізатор повторно;
- одержати продукт, не забруднений ферментом, що є особливо важливим для харчового і фармацевтичного виробництва.

2) Використання гетерогенних каталізаторів дозволяє проводити ферментативний процес безперервно, наприклад у проточних колонках, і регулювати швидкість реакції, що каталізується, а також вихід продукту шляхом зміни швидкості потоку.

3) Імобілізація або модифікація ферменту сприяє цілеспрямованій зміні властивостей каталізатора, у тому числі його специфічності, залежності каталітичної активності від рН, іонної сили розчину, температури та інших параметрів середовища, а також підвищує стійкість (стабільність) до різних денатуруючих факторів у 100–1000 разів.

4) Імобілізація ферментів дає можливість регулювати їхню каталітичну активність шляхом зміни властивостей носія.

Завдяки одержанню нового класу біоорганічних каталізаторів – імобілізованих ферментів – стало можливим налагодження промислового великотоннажного виробництва біотехнологічної продукції, яке піддається автоматизації.

Носії для імобілізації ферментів. Для імобілізації ферментів використовують широкий спектр носіїв. Загалом їх можна поділити на дві основні групи: органічні полімерні та неорганічні носії (рис. 5.19). Носій має дуже велике значення для успішної імобілізації ферментів.

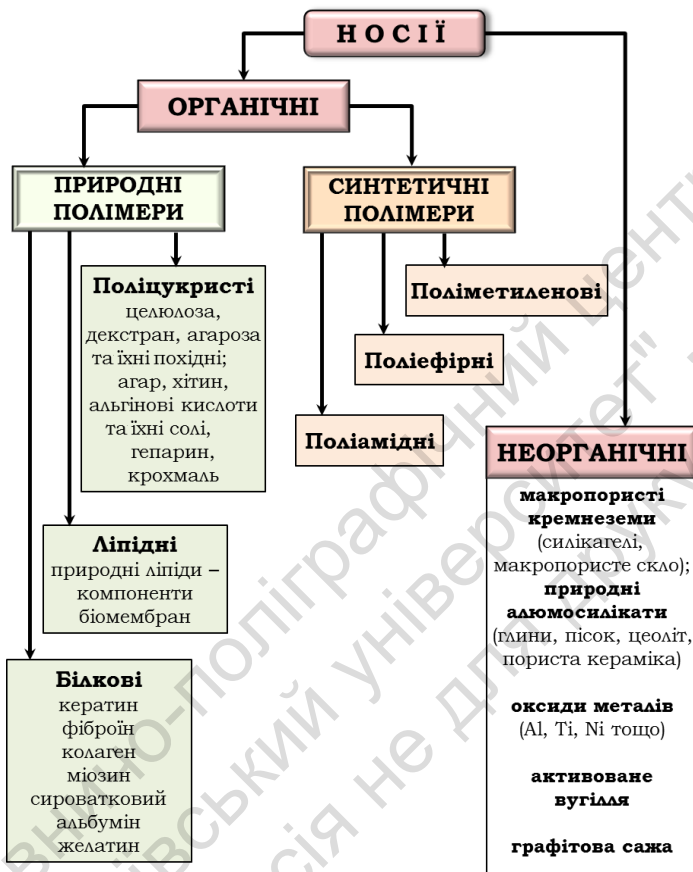


Рис. 5.19. Класифікація носіїв, які використовуються для іммобілізації ферментів

Носії для іммобілізації можуть мати зернисту структуру, бути виконані у вигляді волокон, плівок, пустотілих трубок, мембран тощо. Зазвичай носії використовують у вигляді порошків, дрібних кульок і гранул, інколи, для зниження гідродинамічного опору, – у формі монолітів, пронизаних великою кількістю вузьких паралельних каналів, розділених тонкими стінками. Важливими характеристиками носіїв є питома поверхня, розмір пор, механічна і хімічна стійкість.

До носіїв для ферментів висувають такі вимоги:

- висока хімічна і біологічна стійкість;
- висока механічна міцність;
- достатня проникність для субстратів і продуктів;
- висока пористість;
- можливість одержання у вигляді технологічно зручних форм (гранул, мембран, труб, листів тощо);
- легке переведення в реакційноздатну форму (активація);
- висока гідрофільність, яка забезпечує можливість проведення реакції зв'язування ферменту з носієм у водному середовищі;
- невисока вартість.

Органічні полімерні носії. Існуючі органічні полімерні носії можна поділити на два класи: природні та синтетичні. У свою чергу, клас природних полімерів поділяють на групи відповідно до їхньої біохімічної класифікації: поліцукри, ліпідні й білкові носії. Синтетичні полімери також поділяють на групи відповідно до хімічної будови основного ланцюга макромолекули: поліметиленові, поліамідні та поліефірні носії. Із цієї групи носіїв широкого застосування для іммобілізації ферментів набули природні поліцукри та синтетичні носії поліметиленового типу.

Природні носії. Велике значення природних полімерів як носіїв для іммобілізації пояснюється їх доступністю та наявністю на їхній поверхні реакційноздатних функціональних груп, які легко вступають у різні хімічні реакції, а також високою гідрофільністю. До недоліків природних носіїв належать нестійкість до дії мікроорганізмів і висока вартість деяких із них.

Природні носії – поліцукри – це целюлоза, декстран, агароза та їхні похідні, агар, хітин, альгінові кислоти та їхні солі, гепарин, крохмаль. Серед них найчастіше використовуються похідні целюлози, декстрану, агарози, модифіковані різними хімічними "зшивками". Різні типи таких препаратів у великих масштабах виробляються фірмами для іммобілізації або афінної хроматографії.

Природні носії – ліпіди. Питання щодо білок-ліпідних взаємодій давно привертають увагу дослідників, оскільки *in vivo* більшість ферментативних реакцій перебігають поблизу або на поверхні біомембран – білок-ліпідних утворень. Тому іммобілізація ферментів на природних ліпідних носіях (конструювання ансамблів білок – ліпід) може розглядатися як найоптимальніше наближення до умов функціонування ферментних систем у живій клітині.

Для такої іммобілізації зазвичай використовують природні ліпіди – компоненти біомембран (фосфатидилхолін, фосфатидилетаноламіни, холестерин та ін.). Ліпідні носії застосовуються у вигляді моношарів на різних поверхнях або бішарів (зазвичай сферичної форми – ліпосоми). Для приготування ліпосом найчастіше використовують фосфатидилхолін (лецитин), кардіоліпіни, сфінгомієліни. Ліпосоми – це бульбашки розміром від 20–30 нм до 1–2 мкм, отримані з різних природних або синтетичних фосфоліпідів. Розміщені всередині ліпосом ферменти захищені від швидкого руйнування протеїназами організму, тому перебувають у них відносно тривалий час, виявляючи свою дію.

Білкові носії. До них належать кератин, фіброїн, фібрин, колаген, міозин, сироватковий альбумін, казеїн та ін.

Як носії для іммобілізації ферментів білки частіше використовують під час біохімічних досліджень, а також із практичною метою, особливо в медицині. З погляду практичного значення важливими властивостями білкових носіїв є їхня висока місткість для ферментів, здатність до біодеградації, а також можливість застосування деяких із них (завдяки фібрилярній природі) у вигляді тонкої (завтовшки 80 мкм) плівки (мембрани). Іммобілізацію на білкових носіях можна проводити як за відсутності, так і за наявності "зшиваючих" агентів. До недоліків білків як носіїв медичних препаратів для використання їх *in vivo* слід віднести високу імуногенність (виняток становлять колаген і фібрин). Найчастіше як носії використовують структурні (кератин, фіброїн, колаген), рухові (міозин) і транспортні білки (сироватковий альбумін).

Синтетичні полімерні носії. Величезне різноманіття доступних синтетичних полімерів забезпечує їх широке використання як носіїв для іммобілізації ферментів.

Найширше використовуються полімери на основі стиролу, похідних акрилової кислоти, полівінілового спирту, поліамідів, поліуретанів тощо. Структура і фізико-хімічні властивості синтетичних полімерних носіїв абсолютно різні й варіюють у широких межах. Серед них є носії у вигляді сферичних частинок, гранул, порошків, мембран, трубок, пористі носії з макросітчастою, ізо- та гетеропористою структурами, які використовуються як для сорбційної іммобілізації, так і для одержання гелів і мікрокапсул.

Полімери на основі стиролу є основою для промислових марок іонообмінних матеріалів – "Дауекс" та "Амберліт".

Полімери отримують шляхом різних модифікацій поліакриламідних гелів (ПААГ), що синтезуються на основі акрилової кислоти: аміноалкіл-ПААГ (інша назва – аміноетилбігель Р-150), діоксипропіл-похідні ПААГ (отримані приєднанням до ПААГ нітростиролу), іміноєфірні похідні (сополімеризацією N,N'-метил-біс-акриламід у з мономером) та ін.

Більшість полімерів на основі акрилової кислоти нестійкі до впливу багатьох хімічних реагентів, а також набухають у воді й органічних розчинниках. Тому у випадках, коли необхідна жорстка структура носія, використовують змішаного типу носії – ультрагель на основі синтетичного і природного полімерів. До синтетичних полімерів із жорсткою структурою належать сополімери похідних акрилової кислоти, які випускаються під назвою "Сферон". Це макропористі полімерні гелі. Вони механічно міцні, хімічно і біологічно стійкі. Наявність гідроксильних груп на поверхні надає матриці схожість із сефарозою та високу реакційну здатність. Це дозволяє використовувати розроблені для сефарози методи активації носія.

Для іммобілізації використовують також гелі, що утворюються шляхом радіаційної сополімеризації різних мономерів, таких як N-вінілпіролідон, акриламід, солі акрилової кислоти. Перевагою їх є стійкість до мікробної деградації.

Застосовують і гідрофільні поліуретанові полімери, що утворюються при взаємодії поліізоціанату з поліоксисполуками.

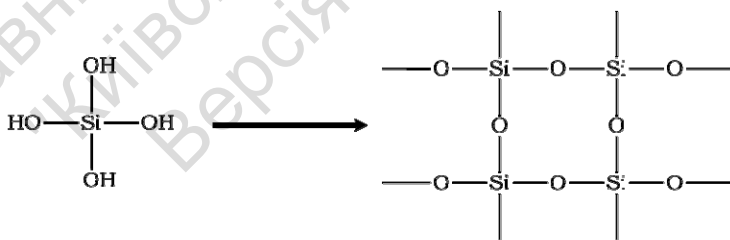
Носії неорганічної природи. Для іммобілізації ферментів використовують також різноманітні неорганічні носії: макропористі кремнеземи – силікагель, сілохром, макропористе скло; метали та їхні оксиди: титан, залізо, алюміній; природні алюмосилікати – різні глини, цеоліти; пористу кераміку, активоване вугілля, сажу.

Асортимент мінеральних носіїв, що випускаються в різних країнах, постійно збільшується, а стандартизація їхніх структурних характеристик (питома поверхня взаємодії, розміри й об'єм пор, розміри зерен) робить їх зручними для використання.

Основними якостями, що зумовлюють широке застосування неорганічних матеріалів як носіїв, є їхня здатність до швидкої регенерації та можливість надання їм будь-якої конфігурації. Останнє – перевага мінеральних носіїв. Носії використовуються як у вигляді порошків, гранул, мембран, трубок, кульок, так і моноліту. Вони можуть бути як пористими, так і непористими.

Найчастіше як носії використовують макропористі кремнеземи (силікагелі, сілохроми та макропористе скло).

Силікагель – це аморфна речовина (загальна хімічна формула $x\text{SiO}_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$). Отримують силікагель у процесі "старіння" (поліконденсації) ортокремнієвої кислоти ($\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$):



ортокремнієва кислота

силікагель

Кремнеземні носії зручні в роботі, однак мають суттєві недоліки: підвищену розчинність у лужному середовищі та неспецифічну адсорбцію ферментів. З метою зниження їх розчинності використовують різні модифікуючі агенти, що дає

змогу цілеспрямовано змінювати властивості поверхні кремнеземних носіїв. Однак такі носії дорогі, а їх модифікація сприяє ще більшому подорожчанняю.

До природних носіїв належать пісок, глини, цеоліти й активоване вугілля. Носії з пористої кераміки дуже різноманітні за складом. Вони можуть містити кремнезем, оксиди титану та цирконію, глинозем. Можна отримати носії без вмісту кремнію. Перевагою цієї групи носіїв є їхня достатньо висока міцність, можливість варіювати склад компонентів, низька вартість.

Найперспективнішими неорганічними носіями є метали та їхні оксиди (алюміній, марганець, нікель, титан, цирконій, магнезит, олово, нержавіюча сталь). Ці носії характеризуються високою механічною міцністю, відносною дешевизною, стабільністю, відмінними гідродинамічними й механічними властивостями, їх легко стандартизувати в заводських умовах.

Методи іммобілізації ферментів. Суть іммобілізації ферментів полягає в прикріпленні їх в активній формі до нерозчинної основи або включенні в напівпроникну мембрану. Існують два типи методів іммобілізації ферментів: фізичні та хімічні.

Фізичні методи. Іммобілізація досягається без утворення ковалентного зв'язку між ферментом і матрицею. Вони поділяються на два типи: адсорбційні та механічні.

При адсорбційній іммобілізації фермент утримується на поверхні носія за рахунок електростатичних, гідрофобних і водневих зв'язків, а також дисперсійних взаємодій. При механічному способі іммобілізації відбувається включення ферменту в гелі, які "зшиті" поперечними зв'язками, або в мікрокапсули, волокна, мембрани тощо. Фізичні методи іммобілізації прості, швидкі та ефективні. Вони широко застосовуються в інженерній ензимології.

Виділяють чотири типи зв'язування ферментів:

- 1) адсорбція на нерозчинних носіях;
- 2) включення в пори гелю;
- 3) просторове відділення ферменту від об'єму реакційної системи за допомогою напівпроникної мембрани;
- 4) включення у двофазне середовище, де фермент розчиняється і перебуває тільки в одній із фаз.

Найпростіший метод іммобілізації ферменту – це адсорбція на нерозчинному носії (рис. 5.20, А). Процедура іммобілізації полягає в змішуванні за придатних умов ферменту й носія, інкубації та відділенні нерозчинного компонента суміші від розчинного центрифугуванням або фільтруванням.

Адсорбція ферментів на носіях здійснюється переважно за рахунок сольових і водневих зв'язків, а також вандерваальсових сил. В ідеальному випадку іммобілізація ферменту не має призводити до втрати каталітичної активності.

Недолік методу полягає в тому, що фермент може зв'язуватися з носієм недостатньо міцно, тобто отримані похідні не володіють стабільністю: вплив незначних умов (рН, іонної сили, температури та природи розчинника) може призвести до десорбції ферменту з носія. Десорбцію ферменту може викликати також субстрат. Указані недоліки зменшують використання методу адсорбції для іммобілізації ферментів.

Переваги методу: простий, легкий у використанні, дешевий, забезпечує високий вихід і рівномірне розподілення зв'язаного ферменту в носії.

Включення ферменту в гель (рис. 5.20, Б). Суть методу полягає в тому, що молекули ферменту включаються у тривимірну сітку зі щільно переплетених полімерних ланцюгів, що утворюють гель. Іммобілізацію ферментів у гелі здійснюють двома способами:

1) Фермент поміщають у водний розчин мономера, а потім проводять полімеризацію, у результаті чого утворюється полімерний гель зі включеними в нього молекулами ферменту. У реакційну суміш часто додають також біфункціональні "зшивачі" агенти, які надають полімеру, що утворюється, структуру тривимірної сітки.

2) Фермент вносять у розчин уже готового полімеру, який потім певним чином переводять у гелеподібний стан.

Основним недоліком методу є те, що полімерна матриця створює значні перешкоди для дифузії субстрату до ферменту, знижуючи цим каталітичну ефективність іммобілізованого препарату.

До переваг методу відносять простоту реалізації, можливість створювати іммобілізовані препарати будь-якої геометричної

конфігурації, забезпечуючи при цьому рівномірний розподіл біокаталізатора в об'ємі носія. Багато полімерних гелів володіють високою механічною, хімічною й температурною стійкістю, що дає змогу багаторазово використовувати іммобілізовані препарати на їх основі. Іммобілізація в гелі зумовлює виражену стабілізацію ферментів і зростання активності до 90 %. Фермент, включений у гель, також надійно захищений від інактивації внаслідок бактеріальної контамінації.

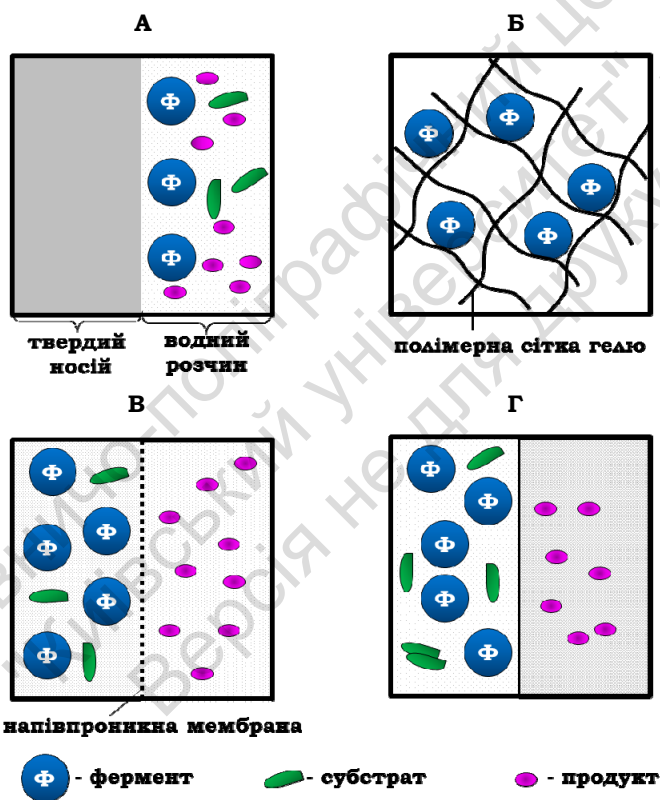


Рис. 5.20. Фізичні методи іммобілізації ферментів:

- А – адсорбція на нерозчинному носії; Б – включення в пори гелю;
 В – відокремлення ферменту за допомогою напівпроникної мембрани;
 Г – використання двофазного реакційного середовища

Імобілізація ферментів з використанням напівпроникних мембран (рис. 5.20, В). Цей метод імобілізації здійснюється таким чином: водний розчин ферменту відділяється від водного розчину субстрату напівпроникною мембраною, яка легко пропускає невеликі молекули субстрату, але є непроникним бар'єром для крупних молекул ферменту.

Перевагами методу є збереження каталітичної активності ферменту, підвищення його стабільності, а також можливість одержувати імобілізовані препарати з високим вмістом включеного ферменту.

Основним недоліком мембранних систем є неможливість ферментативного перетворення високомолекулярних субстратів, для яких мембрана створює дифузійний бар'єр.

Імобілізація ферментів з використанням системи двофазного типу (рис. 5.20, Г). Обмеження руху ферменту досягається завдяки його здатності розчинятися тільки в одній із фаз. Субстрат і продукт ферментативного перетворення розподіляються між двома фазами відповідно до їхньої розчинності в них. Природа фаз підбирається таким чином, щоб продукт накопичувався у фазі, у якій відсутній фермент. Після завершення реакції ця фаза відокремлюється, а продукт вилучається.

Перевагою системи двофазного типу є можливість здійснення ферментативних перетворень високомолекулярних субстратів, які неможливі при застосуванні жорстких носіїв з обмеженим розміром пор. Метод доступний і простий у використанні.

До основних недоліків можна віднести недовготривалу роботу ферменту внаслідок можливої контамінації розчину білка.

Хімічні методи імобілізації ґрунтуються на ковалентному зв'язку молекул ферменту з носієм як органічної, так і мінеральної природи. Основною позитивною якістю препаратів імобілізованих ферментів, одержаних хімічними методами, є наявність міцних хімічних зв'язків між ферментом і носієм. Це вагома експлуатаційна характеристика імобілізованого біокаталізатора, оскільки в процесі його використання фермент

не змивається з носія (десорбція), чим забезпечується висока чистота продуктів реакції, що надзвичайно важливо при одержанні продукції медичного і харчового призначення, а також для забезпечення постійних, відтворюваних результатів у аналітичних системах. Крім того, хімічна іммобілізація ферментів дозволяє суттєво поліпшити важливі для практичного застосування якості – субстратну специфічність, каталітичну активність і стабільність. Саме хімічними методами шляхом багатоточкового ковалентного закріплення білкової структури вдається досягти найбільшої стабілізації ферменту.

До хімічних методів іммобілізації належать іммобілізація за допомогою ковалентного "зшивання" з полімерним носієм і поперечного "зшивання" ковалентними зв'язками молекул білка без носія.

Суттєвим недоліком хімічної іммобілізації є інактивація ферменту. Цього можна уникнути, якщо проводити іммобілізацію за наявності субстрату, який захищатиме активний центр.

Метод ковалентного зв'язування ферментів має два різновиди:

- 1) ковалентні зв'язки утворюються між реактивними групами носія та ферменту (безпосередньо або через проміжну ланку);
- 2) сополімеризаційний метод.

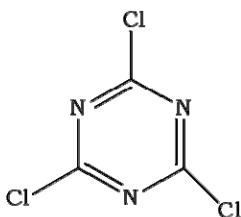
Ковалентні зв'язки утворюються між реактивними групами носія та ферменту (безпосередньо або через проміжну ланку). В утворенні таких зв'язків з боку ферменту беруть участь функціональні групи амінокислотних залишків, з яких найбільшу перевагу мають аміногрупи лізину і карбоксильні групи глутамінової й аспаргінової кислот. Водночас функціональні групи, необхідні для каталітичної активності ферменту, мають залишатися вільними й реакційно спроможними, тому їх часто різними способами захищають (наприклад діючи на тіольні групи відповідними зворотними інгібіторами).

Хімічні підходи дозволяють ковалентно приєднувати ферменти через їх функціональні групи, несуттєві для каталізу (у тому числі $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{SH}$, $-\text{OH}$ та ін.), як до

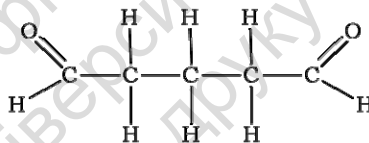
неорганічних носіїв (наприклад пористого скла, кераміки, заліза), так і до природних матеріалів (целюлози, хітину, декстранів, агарози) або синтетичних полімерів (нейлону, полістиролу, поліакриламід, іонообмінних смол тощо).

Вважається доцільним з'єднувати ферменти й матрицю не прямо, а через посередника (місток, спейсер). Молекули таких посередників мають бути невеликого розміру і містити більш ніж одну реакційноздатну групу. Такі властивості мають поліфункціональні реагенти хлористий ціанур і глутаровий альдегід.

Для надання носію високої зв'язувальної здатності його поверхню іноді доводиться активувати.



хлористий ціанур



глутаровий альдегід

Імобілізацію білка на полісахаридній матриці, за класичним методом, здійснюють таким чином: на першій стадії носій окиснюють перйодатом калію до появи альдегідних груп; потім фермент з'єднують з активованим носієм через азометинові зв'язки; для надання більшої стійкості зв'язок між білком і носієм відновлюють боргідром натрію.

Сополімеризаційний метод. Молекули ферменту зв'язуються одна з одною за допомогою біфункціонального реагенту з утворенням нерозчинного суперполімеру, який може розглядатися як носій. Метод гнучкіший порівняно з попереднім завдяки можливості широкого вибору "зшиваючого" реагенту для іммобілізації.

Суть методу полягає в утворенні різного типу тривимірних сіток, вузлами яких є молекули ферменту, ковалентно зв'язані між собою через "зшиваючий" реагент. Розмір молекули

реагенту визначає дифузійні характеристики всієї системи. На першій стадії в молекулу ферменту вводять подвійні зв'язки, що забезпечують здатність до сополімеризації. Наприклад, фермент ацилюють акрилоїлхлоридом, потім акрилоїлований фермент вносять у розчин мономера і проводять сополімеризацію. У результаті фермент виявляється хімічно "вшитим" у полімерну сітку гелю.

Іноді фермент іммобілізують методом ковалентного зв'язування з бичачим сироватковим альбуміном за допомогою глутаральдегіду як "зшиваючого" реагенту. Дві альдегідні групи глутаральдегіду реагують з аміногрупами ферменту та білка носія, "зшиваючи" їх між собою й утворюючи таким чином мембрану. Ці зв'язки стійкі до змін рН, температури. Завдяки обробці фермент стає стабільнішим, однак недоліком процесу є зниження його активності. Від надлишку вільних груп глутаральдегіду звільняються, обробляючи мембрану розчином гліцину. Ковалентна "зшивка" ферменту забезпечує високу міцність зв'язків, що утворюються. Це особливо важливо для забезпечення стійких і відтворюваних результатів у аналітичних системах.

Недоліком методів ковалентних зв'язків є необхідність попередньої активації носія, тривалість інкубації для завершення реакції приєднання та створення спеціальних умов.

Іммобілізація ферментів металохелатним методом. Для уникнення недоліків при іммобілізації ферментів методами ковалентних зв'язків можна використовувати властивості перехідних металів утворювати хелатні комплекси. Як джерела перехідних металів використовують титану хлорид чистий або в кислому розчині, гідроксиди титану, цирконію, хрому (їхні оксиди нетоксичні), заліза, ванадію, олова. Як носії – похідні целюлози та силікагелі, глутаровий альдегід. Желеподібні гідратовані оксиди металів утворюють з ферментом нерозчинні комплекси, що володіють хорошою ферментативною активністю. На целюлозі одержують препарати іммобілізованих ферментів з найбільшою активністю.

Головним завданням іммобілізації ферментів хімічним методом є максимальне збереження каталітичної функції ферменту шляхом використання функціональних груп, які не входять до активного центра ферменту і несуттєві для виявлення каталітичної активності, а також створення умов іммобілізації, які не викликають денатурації білкової молекули. Отже, при хімічній іммобілізації бажано захищати активний центр ферменту. Для цього можна використовувати різні захисні реагенти, субстрати, зворотні інгібітори тощо.

Загальною перевагою іммобілізованих хімічним методом препаратів є чітко визначені й контрольовані властивості, що дуже важливо при використанні їх у медицині та в аналітичній роботі.

Недоліком хімічних методів іммобілізації й одержаних ними препаратів є їхня висока вартість, складність одержання й у зв'язку з цим – недоцільність їх використання у великомасштабних промислових процесах. Більш придатними є препарати, отримані фізичними методами іммобілізації, особливо шляхом адсорбції.

Основні галузі застосування іммобілізованих ферментів.

Широкого використання набули іммобілізовані ферменти й ферментні композиції в *технологічних процесах харчової промисловості*, таких як гідроліз крохмалю, білків, полісахаридів, освітлення вин, соків, поліпшення їх фільтрації, інтенсифікація процесів дифузії; у консервній промисловості; у масложировій – удосконалення процесів рафінації та екстракції, гідроліз масел, поліпшення якості харчових продуктів, удосконалення умов їх зберігання після обробки іммобілізованими ферментами. У харчовій промисловості за участі іммобілізованих ферментів також одержують глюкозо-фруктозні сиропи, глюкозу, яблучну й аспарагінову кислоти, L-амінокислоти, дієтичне безлактозне молоко, цукри з молочної сироватки тощо.

Для *синтетичної органічної хімії* важливим є збереження ферментом каталітичної активності у двофазних реакційних середовищах, навіть за досить малого вмісту води. Тому рівновагу реакції, що каталізується (вихід продукту),

експериментатор може регулювати в широких межах, підбираючи необхідний органічний розчинник.

Імобілізовані ферменти дали поштовх до створення принципово нових методів безреагентного неперервного аналізу багатокомпонентних систем органічних і неорганічних сполук. Головною ланкою в цих методах є "ферментні електроди" та "ферментні термістори". Важливу роль у контролі за станом навколишнього середовища й у клінічній діагностиці відіграють такі методи, як біолоюмінісцентний та імуноферментний аналіз.

Проблеми *біоконверсії енергії та маси* також намагаються розв'язувати біотехнологічними методами з використанням імобілізованих ферментів при фотолізі води та біоелектрокаталізі, створенні паливних елементів. Перспективним є використання імобілізованих ферментів у процесах переробки лігніноцелюлозної сировини.

Імобілізовані ферменти можуть застосовуватися також як *штучні підсилювачі слабких сигналів*. На активний центр імобілізованого ферменту можна подіяти через носій, піддаючи його ультразвуковому впливу чи фотохімічним перетворенням. Це дозволяє регулювати каталітичну активність системи фермент – носій під дією механічних, ультразвукових і світлових сигналів. На цій основі були створені механічно- та звукочутливі датчики й відкрито шлях до створення безсрібної фотографії.

На сьогодні найінтенсивніше розвивається *використання імобілізованих ферментних препаратів у медицині*. Застосування ферментів та інших біологічно активних речовин білкової природи в терапії має давні традиції. Сучасна медицина широко використовує високоочищені препарати біологічно активних речовин білкової природи як перспективні засоби медикаментозного лікування завдяки їхній високій активності та специфічності. Нині визначилися такі основні напрями ензимотерапії:

- 1) усунення дефіциту ферментів з метою компенсації вродженої або набутої функціональної недостатності;

- 2) видалення нежиттєздатних, денатурованих структур, клітинних і тканинних уламків;
- 3) лізис тромбів;
- 4) комплексна терапія злоякісних новоутворень;
- 5) детоксикація організму.

Як лікувальні препарати ферменти застосовують із метою поповнення відсутніх в організмі каталізаторів, що виникає внаслідок генетичних чи інших патологічних порушень, а також для специфічного руйнування шкідливих продуктів обміну, що накопичуються в організмі хворого.

Дуже важливою проблемою є лікування уроджених ензимопатій. Нині досліджено майже 150 уроджених лізосомних хвороб накопичення, за яких через генетично зумовлену відсутність того чи іншого ферменту в клітині відбувається летальне нагромадження субстрату. Сюди ж варто віднести захворювання, що виникають через відсутність ферменту, який каталізує певну стадію обміну. Наприклад, фенілкетонурія (хвороба, яка призводить до затримки розумового розвитку) викликається нестачею ферменту, що перетворює фенілаланін на тирозин. Відсутність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази в еритроцитах призводить до виникнення невиліковного захворювання — фавізму. Захворювання печінки й нирок супроводжуються нагромадженням в організмі токсичних продуктів життєдіяльності.

Теоретично з лікувальною метою в таких випадках потрібно ввести хворому відсутній фермент із чужорідного джерела. Однак спроби лікувати внутрішньовенним введенням відповідних нативних ферментів, виділених із біологічних рідин і тканин, не дали бажаних результатів, особливо при лікуванні лізосомних хвороб.

Причиною неефективності терапії нативними ферментами є швидке виведення чужорідних білків-ферментів із кровотоку і захоплення їх печінкою ще до початку дії, а також зумовлені ними як чужорідними білками побічні реакції (антигенність, алергенність, токсичність тощо), що може стати причиною летального кінця.

У живому організмі ферменти й фізіологічно важливі білки майже завжди містяться всередині клітини. При цьому фермент перебуває в оточенні, яке здатне підтримувати його нативну структуру, і часто локалізований у безпосередній близькості до інших ферментів, які переробляють продукт його реакції. Ферментативні системи взаємодіють із субстратами через мембрану клітини за допомогою різних транспортних механізмів.

При безпосередньому введенні ферменту в організм він може потрапити в умови, які сприятимуть його денатурації; тоді активність ферменту буде стрімко знижуватись одразу після ін'єкції. Небезпечними для ферментів є протеїнази організму, які розщеплюють уведений білок на неактивні пептиди, а також інгібітори, які зв'язуються з ферментом через активний центр. У результаті вони будуть утилізовані лейкоцитами й фагоцитами. Крім цього, уведений у нативному стані фермент як речовина високої молекулярної маси дифундуватиме дуже повільно в потрібне місце (хворий орган), а введенний безпосередньо в хвору ділянку – швидко вимиватися кровотоком або іншими рідинами.

Отже, повсякденне клінічне використання ферментів обмежене як економічними факторами (високою вартістю і малодоступністю), так і швидкою інактивацією в організмі, а також спричиненням ними як чужорідними білками різних побічних реакцій (антигенність, алергенність, токсичність тощо). Тому одним з актуальних напрямів інженерної ензимології є розробка й упровадження саме іммобілізованих терапевтичних ферментних препаратів.

Запитання для самоконтролю

1. Що лежить в основі сучасної інженерної ензимології?
2. Які переваги мають мікроорганізми як джерела ферментів?
3. Які основні етапи одержання товарних форм ферментних препаратів?

4. Що таке стандартизація ферментів? Як характеризують ферментні препарати?

5. Що таке іммобілізація та іммобілізовані ферменти? З якою метою проводиться іммобілізація ферментів?

6. Які носії використовують для іммобілізації та як вони класифікуються?

7. Що таке органічні полімерні носії? Охарактеризуйте їх.

8. Чим відрізняються носії неорганічної природи?

9. Якими методами можна здійснити іммобілізацію ферментів?

ЛІТЕРАТУРА

1. Антипова Л. В. Прикладная биотехнология : учеб. пособие / Л. В. Антипова, И. А. Глотова, А. И. Жаринов. – Воронеж : Воронеж. гос. технол. акад., 2000.
2. Бирюков В. В. Основы промышленной биотехнологии / В. В. Бирюков. – М. : Колосс, 2004.
3. Газит Э. Нанобиотехнология: необъятные перспективы развития / Э. Газит. – М. : Научный мир. – 2011.
4. Пирог Т. П. Загальна біотехнологія : підручник / Т. П. Пирог, О. А. Ігнатова. – К. : НУХТ, 2009.
5. Ravi Indu. Advances in Biotechnology / Indu Ravi, Mamta Baunthiyal, Jyoti Saxena. – Springer, 2014.
6. Zhang Tong-Cum. Advances in Applied Biotechnology / Tong-Cum Zhang, Motowo Nakajima. – Springer, 2015.
7. P. Shukla. Advances in Enzyme Biotechnology / P. Shukla, B. I. Pletschke. – Springer, 2013.
8. Saxena S. Applied Microbiology / S. Saxena. – Springer, 2015.
9. Biotechnology: Prospects and Applications / R. K. Salar, S. K. Gahlawat, P. Siwach, J. S. Duhan. – Springer, 2013.

10. Crommelin Daan J. A. Pharmaceutical Biotechnology. Fundamental and Applications / Daan J. A. Crommelin, Robert D. Sindelar, Bernard Meibohm. – Springer, 2013.
11. Pasupuleti V. Protein Hydrolysates in Biotechnology / V. Pasupuleti, A. Demain. – Springer, 2010.
12. Xie Yubing. The Nanobiotechnology Handbook / Yubing Xie. – CRC Press, 2013.
13. Біохімія : підручник / Л. І. Остапченко, Т. А. Андрійчук, Ю. Д. Бабенюк та ін. – К. : ВПЦ "Київ. ун-т", 2012.
14. Біохімія ензимів / М. М. Марченко, Л. В. Худа, М. М. Великий, Л. І. Остапченко. – Чернівці : Чернівець. нац. ун-т, 2012.
15. Юлевич О. І. Біотехнологія : навч. посіб. / О. І. Юлевич, С. І. Ковтун, М. І. Гиль. – Миколаїв : МДАУ, 2012.
16. Грегірчак Н. М. Імобілізовані ферменти і клітини в біотехнології / Н. М. Грегірчак, М. М. Антонюк. – К. : НУХТ, 2011.
17. Волова Т. Г. Введение в биотехнологию : электрон. учеб. пособие / Т. Г. Волова. – Красноярск : ИПК СФУ, 2008.
18. Біотехнологія : підручник / В. Г. Герасименко, М. О. Герасименко, М. І. Цвіліховська та ін. – К. : Фірма "ІНКОС", 2006.

19. Бабенюк Ю. Д. Біохімія: терміни і номенклатура ферментів : навч. посіб. / Ю. Д. Бабенюк, Л. І. Остапченко, О. В. Скопенко. – К. : ВПЦ "Київський університет", 2005.

20. Юлевич О. І. Загальна біотехнологія : метод. рекомендації щодо розрахунків критеріїв ефективності біотехнологічних процесів / О. І. Юлевич. – Миколаїв. нац. аграр. ун-т, 2017.

21. Евтушенков А. Н. Введение в биотехнологию : курс лекций / А. Н. Евтушенков, Ю. К. Фомичев. – Минск : БГУ, 2002.

Навчальне видання

КРАВЧЕНКО О. О.
САВЧУК О. М.
ОСТАПЧЕНКО Л. І.

ОСНОВИ БІОТЕХНОЛОГІЇ

Навчальний посібник

Оригінал-макет виготовлено ВПЦ "Київський університет"



Формат 60x84^{1/16}. Ум. друк. арк. 15,7. Наклад 100. Зам. № 219-9124.
Гарнітура Times New Roman. Папір офсетний. Друк офсетний. Вид. № Іф12
Підписано до друку 05.04.19

Видавець і виготовлювач
ВПЦ "Київський університет"

6-р Т. Шевченка, 14, м. Київ, 01601,

☎ (044) 239 32 22; (044) 239 31 72; тел./факс (044) 239 31 28

e-mail: vpc_div.chief@univ.net.ua; redaktor@univ.net.ua

<http://vpc.univ.kiev.ua>

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 1103 від 31.10.02