

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ факультет медико-
фармацевтичних технологій кафедра біотехнології**

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА на тему: «ДОСЛІДЖЕННЯ ЩОДО
ЗАСТОСУВАННЯ БІОКАТАЛІЗУ ДЛЯ ОТРИМАННЯ
УРСОДЕЗОКСИХОЛІЄВОЇ КИСЛОТИ»**

Виконав: здобувач вищої освіти групи ПБтм24(1,6д)-01
спеціальності: 162 Біотехнології та біоінженерія освітньої
програми Промислова біотехнологія

Вікторія КАПЛЮК

Керівник: Завідувачка кафедри біотехнології, д.фарм.н,
професор Наталя ХОХЛЕНКОВА

Рецензент: професорка закладу вищої освіти кафедри
промислової технології ліків та косметичних засобів,
д.фарм.н., професор Інна КОВАЛЕВСЬКА

АНОТАЦІЯ

Кваліфікаційна робота присвячена дослідженню біокаталітичних підходів до отримання урсодезоксихолевої кислоти (UDCA), що є важливою жовчною кислотою, широко застосовуваною у фармакотерапії захворювань печінки. Актуальність роботи зумовлена необхідністю впровадження екологічно безпечних та технологічно ефективних методів синтезу UDCA.

У роботі проаналізовано промислові методи отримання урсодезоксихолевої кислоти та обґрунтовано перспективність біокаталізу з використанням гідроксистероїддегідрогеназ і рекомбінантних мікроорганізмів. Особливу увагу приділено оптимізації стадій очищення біокаталітичних систем шляхом застосування флокуляції.

Загальний обсяг роботи становить 61 сторінку, вона містить 6 таблиць, 13 рисунків, 31 джерело літератури та 1 додаток.

Ключові слова: урсодезоксихолева кислота, біокаталіз, гідроксистероїддегідрогенази, рекомбінантні мікроорганізми, флокуляція.

ANNOTATION

The qualification work is focused on the study of biocatalytic approaches for the production of ursodeoxycholic acid (UDCA), an important bile acid widely used in the treatment of liver diseases. The relevance of the study is determined by the need for environmentally friendly and technologically efficient UDCA synthesis methods.

The work analyses industrial production methods of ursodeoxycholic acid and substantiates the advantages of biocatalysis using hydroxysteroid dehydrogenases and recombinant microorganisms. Special attention is paid to the optimisation of purification stages through the application of flocculation.

The total volume of the work is 61 pages and includes 6 tables, 13 figures, 31 references, and 1 appendix.

Keywords: ursodeoxycholic acid, biocatalysis, hydroxysteroid dehydrogenases, recombinant microorganisms, flocculation.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	4
РОЗДІЛ 1	8
1.1. Урсодезоксихолева кислота: хімічна будова, біологічна дія та застосування в медицині	8
1.2. Промислові методи отримання урсодезоксихолевої кислоти.....	13
1.2.1. Хімічні методи синтезу UDCA.....	13
1.2.2. Хемоензиматичні методи отримання урсодезоксихолевої кислоти	15
1.2.3. Біокаталітичні методи отримання урсодезоксихолевої кислоти.....	16
Висновки до розділу 1	20
РОЗДІЛ II	22
2.1. Мікроорганізми-продуценти гідроксистероїддегідрогеназ: від природних ізолятів до рекомбінантних штамів.....	22
2.2. Рекомбінантні штами як високоефективні біокаталізатори.....	23
2.3. Об'єкти досліджень	25
2.4. Методи дослідження:	
288	30
РОЗДІЛ III	39
3.1. Аналіз технологічного циклу біокаталітичного виробництва UDCA та стратегії оптимізації Downstream стадій	39
3.2. Флокуляція як метод інтенсифікації технологічного процесу	41
3.3. Оцінка впливу концентрації флокулянта ClariSolve® PDADMAC на підготовку клітинного гомогенату.....	43
3.3.1. Вплив флокуляції на збереження білкової фракції клітинного гомогенату	45
3.3.2. Вплив флокуляції на каламутність клітинного гомогенату	45
3.3.3. Редукція ДНК у процесі флокуляційної обробки.....	47
3.3.4. Аналіз білкового складу методом SDS-PAGE.....	49
3.3.5. Вибір оптимальної концентрації флокулянта.....	50
3.4. Оцінка вплив флокуляційної обробки на стабільність хроматографічної	53
очистки.....	53

Висновки до розділу 3	55
ВИСНОВКИ	56
ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ	58
ДОДАТОК.....	62

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

UDCA — урсодезоксихолева кислота

УДХК — урсодезоксихолева кислота СА

— холева кислота

CDCA — хенодезоксихолева кислота

DCA — дезоксихолева кислота

LCA — літохолева кислота

DHCA — дегідрохолева кислота

HSDH — гідроксистероїддегідрогенази

3 α -HSDH — 3 α -гідроксистероїддегідрогеназа

7 α -HSDH — 7 α -гідроксистероїддегідрогеназа 7 β -HSDH

— 7 β -гідроксистероїддегідрогеназа

12 α -HSDH — 12 α -гідроксистероїддегідрогеназа

IMAC — метал-афінна хроматографія (Immobilized Metal Affinity Chromatography)

PCR / ПЛР — полімеразна ланцюгова реакція

qPCR — кількісна полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі NAD⁺

/ NADH — нікотинамідаденіндинуклеотид (окиснена / відновлена форма)

NADP⁺ / NADPH — нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат (окиснена / відновлена форма)

TE-буфер — трис-ЕДТА буфер

BSA — бичачий сироватковий альбумін

OD — оптична густина

- SDS-PAGE — електрофорез у поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію

fed-batch — напівперіодичний режим культивування

His₆-тег — гексагістидинова афінна мітка

GRAS — Generally Recognised As Safe

- Downstream processing — стадії очищення та виділення продукту

ВСТУП

Актуальність теми. Урсодезоксихолева кислота (UDCA) є однією з найбільш клінічно значущих жовчних кислот, що широко застосовується у лікуванні холестатичних захворювань печінки, жовчнокам'яної хвороби та інших патологій гепатобіліарної системи. Висока терапевтична ефективність і сприятливий профіль безпеки зумовлюють стабільно високий попит на дану активну фармацевтичну субстанцію.

Традиційні методи промислового отримання урсодезоксихолевої кислоти базуються на багатостадійному хімічному або хемоензиматичному синтезі, що супроводжується використанням агресивних реагентів, значними енерговитратами та екологічним навантаженням. У контексті сучасних вимог до сталого розвитку фармацевтичної промисловості актуальним є пошук більш селективних і екологічно безпечних технологічних рішень.

Перспективним напрямом удосконалення технології отримання UDCA є застосування біокаталітичних методів із використанням ферментів або рекомбінантних мікроорганізмів, які забезпечують високу стереоселективність процесів за м'яких умов. Водночас практичне впровадження біокаталізу обмежується складністю стадій очищення біокаталітичних систем, зокрема лізатів рекомбінантних клітин.

У цьому аспекті дослідження технологічного циклу біокаталітичного отримання урсодезоксихолевої кислоти та розробка підходів до оптимізації downstream-стадій, зокрема із застосуванням флокуляції, є актуальним науково-практичним завданням.

Метою даної роботи проаналізувати фізико-хімічні та біотехнологічні особливості урсодезоксихолевої кислоти, сучасні підходи до її біокаталітичного отримання та дослідити ефективність флокуляції як методу інтенсифікації downstream processing при очищенні рекомбінантних біокаталітичних систем

Предметом дослідження є біокаталітичні системи синтезу урсодезоксихолевої кислоти, зокрема ферментні та клітинні системи на основі гідроксистероїддегідрогеназ, а також технологічні параметри очищення біокаталітичних реакційних сумішей.

Об'єктом дослідження є біотехнологічний процес отримання урсодезоксихолевої кислоти з використанням біокаталізу на основі рекомбінантних мікроорганізмів..

Для досягнення мети поставлено такі завдання:

1. Проаналізувати фізико-хімічні та фармакологічні властивості урсодезоксихолевої кислоти та її місце в сучасній фармакотерапії.
2. Охарактеризувати промислові хімічні, хемоензиматичні та біокаталітичні методи отримання урсодезоксихолевої кислоти.
3. Дослідити роль гідроксистероїддегідрогеназ і мікроорганізмів-продуцентів у біокаталітичному синтезі UDCA.
4. Проаналізувати структуру технологічного циклу біокаталітичного виробництва урсодезоксихолевої кислоти з використанням рекомбінантних систем *Escherichia coli*.
5. Дослідити вплив флокуляційної обробки на властивості клітинного гомогенату та підготовку матеріалу до подальших стадій очищення.

Методи наукових досліджень. У роботі використано методи описового аналізу наукової та патентної літератури, аналітичні та графічні методи узагальнення інформації, а також технологічні методи аналізу біокаталітичних процесів і стадій downstream processing з урахуванням сучасних промислових підходів.

Практичне значення отриманих результатів. Результати роботи можуть бути використані для наукового обґрунтування вибору біокаталітичних систем та технологічних рішень у процесі отримання урсодезоксихолевої кислоти. Запропоновані підходи до оптимізації очищення біокаталітичних систем із застосуванням флокуляції можуть бути корисними для фармацевтичних та біотехнологічних підприємств, а також для навчального процесу при підготовці фахівців у галузі біотехнології та фармацевтичної технології.

Апробація результатів дослідження і публікації.

1. Каплюк В. В., Хохленкова Н. В. Біокаталітичний синтез урсодезоксихолевої кислоти: сучасні стратегії та промислові перспективи. Youth Pharmacy Science: матеріали VI Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю (10-11 грудня 2025 р., м. Харків). – С. 198-199.

Структура та обсяг кваліфікаційної роботи

Робота складається зі вступу, трьох розділів: літературний огляд, об'єкти та методи досліджень, опис технологічного процесу біокаталітичного отримання урсодезоксихолевої кислоти, висновку. Загальний обсяг роботи 61 сторінка, кількість таблиць 6, рисунків 13, джерел літератури 31, додатків 1.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Урсодезоксихолева кислота: хімічна будова, біологічна дія та застосування в медицині

Урсодезоксихолева кислота (УДХК, ursodeoxycholic acid, UDCA) є вторинною жовчною кислотою, яка в нормі утворюється в організмі людини в незначних кількостях у результаті біохімічних перетворень первинних жовчних кислот за участю кишкової мікробіоти. Незважаючи на низьку природну концентрацію, урсодезоксихолева кислота відіграє важливу роль у регуляції складу жовчі та функціонального стану гепатобіліарної системи. У сучасній медицині UDCA є одним із найбільш широко застосовуваних препаратів для лікування холестатичних захворювань печінки, що зумовлює значний інтерес до вивчення її властивостей та вдосконалення технологій отримання.

За хімічною природою урсодезоксихолева кислота належить до класу стероїдних карбонових кислот і має формулу $3\alpha,7\beta$ -дигідрокси- 5β -холан-24ової кислоти. Основу її молекули становить характерне для жовчних кислот стероїдне ядро, до якого приєднаний бічний ланцюг з карбоксильною групою. Структурною особливістю UDCA є наявність двох гідроксильних груп, розташованих у положеннях C-3 та C-7 стероїдного кільця. При цьому гідроксильна група в положенні C-3 має α -орієнтацію, тоді як у положенні C-7 вона перебуває у β -орієнтації. Загальна структура жовчних кислот і варіанти заміщення функціональних груп у положеннях R^1 – R^4 наведені на рис.1.1 [21].

Як видно з рис.1.1, гідрофобність жовчних кислот істотно залежить від кількості та просторової орієнтації гідроксильних груп у стероїдному ядрі. Урсодезоксикохілева кислота містить дві гідроксильні групи, розташовані в положеннях C-3 та C-7, причому гідроксильна група в положенні C-3 має α -орієнтацію, тоді як у положенні C-7 вона орієнтована в β -положенні. Саме β -орієнтація гідроксильної групи в положенні C-7 є принциповою структурною

відмінністю UDCA від хенодезоксихолевої кислоти (CDCA), у якій відповідна гідроксильна група має α -орієнтацію [8].

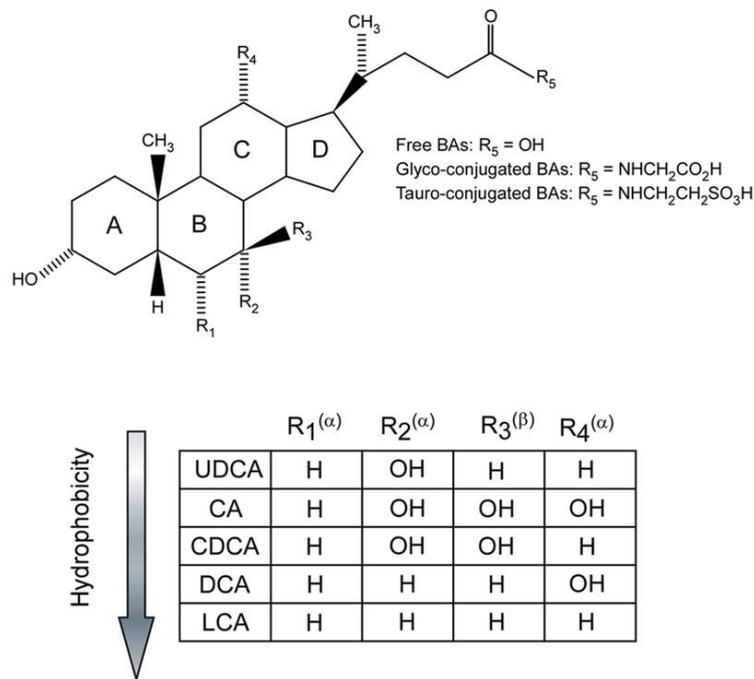


Рис. 1.1 – Загальна структура жовчних кислот та їх порівняльна гідрофобність залежно від кількості й орієнтації гідроксильних груп (UDCA, CA, CDCA, DCA, LCA). Джерело: Modica S., Gadaleta R.M., Moschetta A. Deciphering the nuclear bile acid receptor FXR paradigm. *Nuclear Receptor Signaling*, 2010, 8:e005 (PMCID: PMC3049226).

Порівняльний аналіз, наведений на рис.1.1, демонструє, що урсодезоксихолева кислота є однією з найменш гідрофобних жовчних кислот. Гідрофобність зростає в ряду $\text{UDCA} < \text{CA} < \text{CDCA} < \text{DCA} < \text{LCA}$, що має принципове значення для біологічної дії цих сполук. Менша гідрофобність UDCA зумовлює її знижену цитотоксичність і слабшу здатність до ушкодження клітинних мембран порівняно з більш гідрофобними жовчними кислотами, такими як дезоксихолева та літохолева кислоти.

Наявність β -орієнтованої гідроксильної групи в положенні C-7 зумовлює зміну просторової конфігурації молекули UDCA, що, у свою чергу, визначає її фізико-хімічні та біологічні властивості.

Деталізована порівняльна характеристика хімічної будови основних жовчних кислот і їхніх кон'югатів представлена на рис.1.2. У цій схемі чітко показано положення та орієнтацію гідроксильних груп у стероїдному ядрі, а також варіанти кон'югації бічного ланцюга з гліцином або таурином.

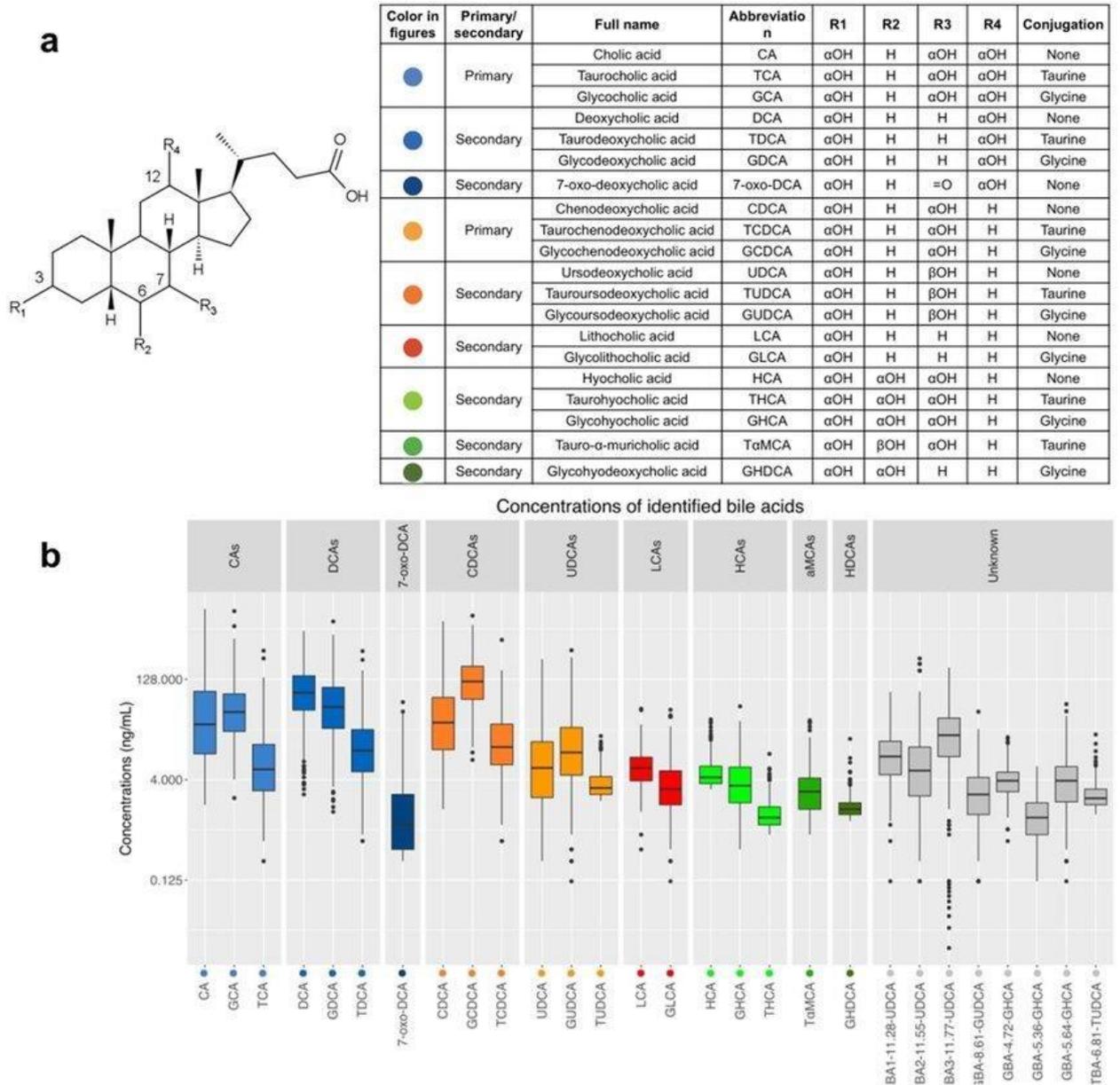


Рис. 1.2 Хімічні структури жовчних кислот та їхніх гліко- і таурокон'югатів із зазначенням положення та просторової орієнтації гідроксильних груп (CA, CDCA, DCA, DHCA, LCA, UCA, UDCA). Джерело: Tonin F., Arends I.W.C.E. Latest development in the synthesis of ursodeoxycholic acid (UDCA): a critical review. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 2018, 14, 470–483.

Важливою характеристикою урсодезоксихолевої кислоти є її амфифільна природа. Амфифільна природа урсодезоксихолевої кислоти, як і інших жовчних кислот, зумовлена наявністю чітко розмежованих гідрофільної та гідрофобної поверхонь молекули. Гідрофільна поверхня формується гідроксильними групами та карбоксильним фрагментом, тоді як гідрофобна представлена стероїдним ядром. Така будова забезпечує здатність UDCA до орієнтації на межі фаз і утворення міцел у водному середовищі, що є необхідною умовою для емульгування ліпідів і регуляції складу жовчі [18].

На рис. 1.3 схематично представлено амфифільну будову жовчних кислот та принцип їх орієнтації у водному середовищі з утворенням міцел. Цей механізм має фундаментальне значення для біологічної функції урсодезоксихолевої кислоти, оскільки забезпечує емульгування ліпідів, зниження поверхневого натягу та підвищення розчинності гідрофобних сполук у жовчі. Гідрофільна (вогнута) поверхня містить гідроксильні групи, що забезпечує здатність до взаємодії з водою, тоді як гідрофобна (випукла) поверхня взаємодіє з ліпідами.

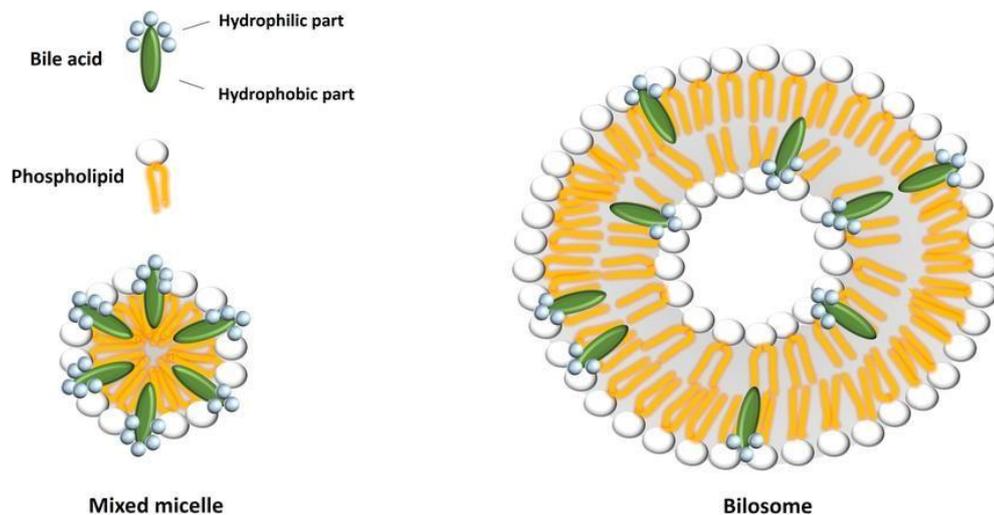


Рис. 1.3 Схема амфифільної будови молекули жовчної кислоти та механізм формування міцел у водному середовищі. (джерело: Pavlović, Nebojša &

Golacorbin-Kon, Svetlana & Đanić (Stojančević), Maja & Stanimirov, Bojan & AlSalami, Hani & Stankov, Karmen & Mikov, Momir. (2018). Bile Acids and Their Derivatives as Potential Modifiers of Drug Release and Pharmacokinetic Profiles. *Frontiers in Pharmacology*. 9. 10.3389/fphar.2018.01283.

Як показано на рис. 1.3, жовчні кислоти здатні утворювати не лише прості міцели, а й складніші асоціати — змішані міцели (з фосфоліпідами) та білосоми, що відіграють ключову роль у фармакокінетиці ліпофільних препаратів.

Біологічна дія урсодезоксихолевої кислоти є комплексною та включає декілька взаємопов'язаних механізмів. Одним із ключових ефектів UDCA є зменшення гідрофобності загального пулу жовчних кислот, що призводить до зниження їх цитотоксичного впливу на клітини печінки. Крім того, урсодезоксихолева кислота здатна пригнічувати апоптоз гепатоцитів, індукований оксидативним стресом та токсичними жовчними кислотами, а також модулювати експресію генів, залучених до запальних і імунних процесів [9].

Завдяки цим властивостям урсодезоксихолева кислота широко застосовується в клінічній практиці. Основними показаннями до призначення препаратів UDCA є первинний біліарний холангіт, первинний склерозуючий холангіт, внутрішньопечінковий холестаза різної етіології, а також жовчнокам'яна хвороба, зокрема для розчинення холестеринових жовчних каменів [30]. У клінічних дослідженнях доведено, що урсодезоксихолева кислота має сприятливий профіль безпеки та може застосовуватися протягом тривалого часу без розвитку значних побічних ефектів [3].

Перевагою урсодезоксихолевої кислоти над іншими жовчними кислотами є поєднання високої терапевтичної ефективності з низькою токсичністю. Саме тому UDCA вважається жовчною кислотою вибору для фармакотерапії холестатичних захворювань печінки та широко використовується у складі лікарських препаратів. Зростаючий попит на урсодезоксихолеву кислоту як активний фармацевтичний інгредієнт зумовлює

необхідність розробки ефективних, економічно доцільних та екологічно безпечних методів її отримання, що обґрунтовує актуальність подальшого розгляду промислових та біокаталітичних шляхів синтезу UDCA.

1.2. Промислові методи отримання урсодезоксихолевої кислоти

У зв'язку з широким застосуванням UDCA у клінічній практиці та стабільно високим попитом на лікарські засоби на її основі, розробка ефективних і технологічно доцільних методів отримання цієї сполуки є актуальним завданням сучасної фармацевтичної та біотехнологічної промисловості. Структурна складність молекули UDCA, зумовлена наявністю стероїдного ядра та декількох асиметричних центрів, істотно ускладнює її синтез і визначає необхідність використання багатостадійних технологічних схем.

На сьогодні у промисловій практиці застосовують три основні підходи до отримання UDCA: хімічні, хемоензиматичні та біокаталітичні методи. Кожен із зазначених підходів має свої переваги й обмеження з точки зору селективності, економічної доцільності, екологічної безпеки та можливості масштабування.

1.2.1. Хімічні методи синтезу UDCA

Історично першими були розроблені хімічні методи синтезу урсодезоксихолевої кислоти, які базуються на використанні природних жовчних кислот як вихідної сировини. Найчастіше в промислових схемах застосовують холеву або хенодезоксихолеву кислоту, які отримують із жовчі великої рогатої худоби. Основною складністю таких підходів є необхідність селективної епімеризації гідроксильної групи в положенні С-7 стероїдного ядра, а також видалення або модифікації інших функціональних груп без порушення конфігурації молекули [11, 21].

Класичні хімічні маршрути синтезу урсодезоксихолевої кислоти включають значну кількість стадій (як правило, від шести до восьми), серед яких реакції захисту та деблокування функціональних груп, окисно-відновні перетворення, а також жорсткі реакційні умови з використанням токсичних реагентів і органічних розчинників.

Узагальнену схему хімічного багатостадійного синтезу урсодезоксихолевої кислоти з використанням реакцій захисту функціональних груп, окисновідновних стадій та редукції за Вольфом–Кішнером наведено на рис.1.4.

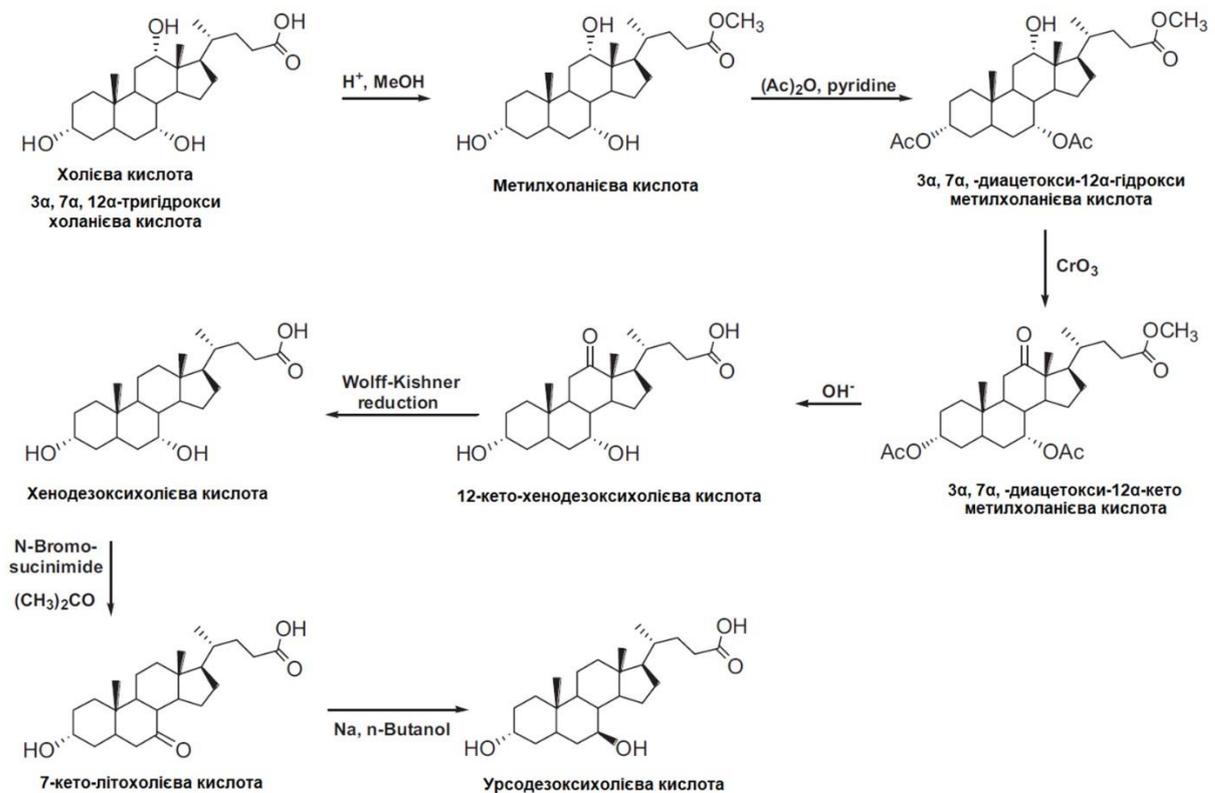


Рис.1.4 Узагальнена схема багатостадійного хімічного синтезу UDCA з використанням природних жовчних кислот як вихідної сировини. (Адаптовано [21]).

До основних недоліків хімічних методів належать низька стереоселективність окремих стадій, утворення значної кількості побічних продуктів, високі витрати реагентів та енергії, а також суттєве екологічне навантаження. Крім того, загальний вихід цільового продукту за такими

схемами зазвичай не перевищує 30–35 %, що обмежує економічну ефективність суто хімічного синтезу.

1.2.2. Хемоензиматичні методи отримання урсодезоксихолевої кислоти

Подальший розвиток технологій синтезу урсодезоксихолевої кислоти привів до впровадження хемоензиматичних підходів, які поєднують хімічні стадії з використанням ферментативних реакцій. У таких підходах ферменти використовують переважно для селективної модифікації функціональних груп стероїдного ядра, тоді як стадії глибокого окиснення або повної редукції реалізують хімічними методами [15].

Найпоширенішим хемоензиматичним підходом є перетворення хенодезоксихолевої кислоти в урсодезоксихолеву шляхом селективної епімеризації гідроксильної групи в положенні С-7. Ключову роль у цьому процесі відіграють гідроксистероїдні дегідрогенази (HSDH), зокрема 3 α -HSDH, 7 α -HSDH, 7 β -HSDH та 12 α -HSDH. Ці ферменти каталізують селективні окисно-відновні перетворення жовчних кислот, забезпечуючи контроль просторової орієнтації гідроксильних груп. Водночас окремі стадії синтезу здійснюються із застосуванням хімічних реагентів, таких як хром(VI) оксид для окиснення або реакція Вольфа–Кішнера для повної редукції карбонільних груп [6, 27].

Узагальнену хемоензиматичну схему синтезу урсодезоксихолевої кислоти, що включає як ферментативні, так і хімічні стадії, наведено на рис.1.5.

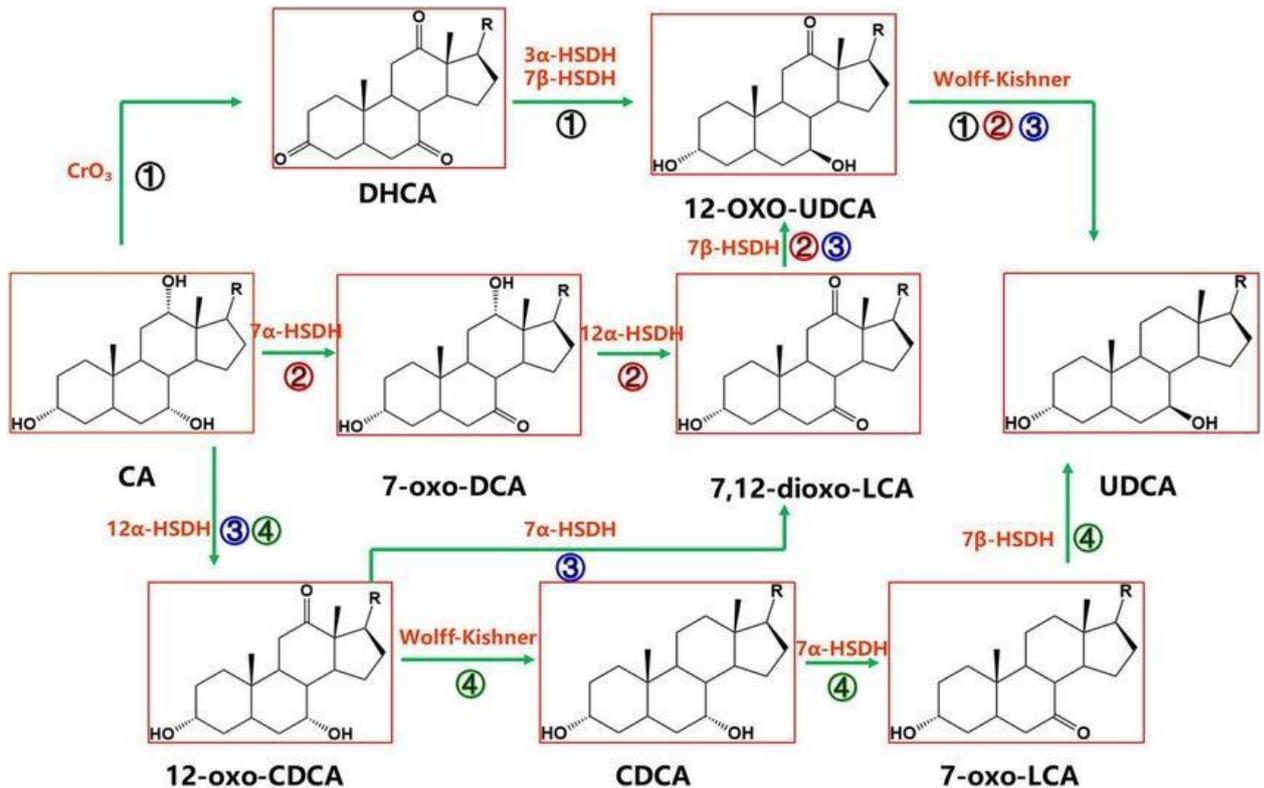


Рис. 1.5. Хемоензиматичні маршрути отримання урсодезоксихолевої кислоти з холевої кислоти.

DHCA — дегідрохолева кислота; 12-оксо-УДХК — 12-оксо-урсодезоксихолева кислота; CA — холева кислота; 7-оксо-DCA — 7-оксо-дезоксихолева кислота; 7,12-діоксо-LCA — 7,12-діоксо-літохолева кислота; UDCA — урсодезоксихолева кислота; 12-оксо-CDCA — 12-оксо-хенодезоксихолева кислота; CDCA — хенодезоксихолева кислота; R — 4-пентинова кислота. ① — маршрут 1; ② — маршрут 2; ③ — маршрут 3; ④ — маршрут 4.

Застосування хемоензиматичних методів дозволяє істотно зменшити кількість хімічних стадій і підвищити селективність процесу. Водночас наявність хімічних етапів у загальній схемі зберігає частину недоліків традиційних методів, зокрема використання органічних розчинників і необхідність складних стадій очищення [6].

1.2.3. Біокаталітичні методи отримання урсодезоксихолевої кислоти

Найбільш перспективним напрямом розвитку промислових технологій отримання урсодезоксихолевої кислоти є застосування біокаталітичних

методів, які базуються виключно або переважно на використанні ферментів чи клітин систем мікроорганізмів без залучення агресивних хімічних реагентів. Біокаталіз забезпечує проведення реакцій за м'яких умов, з високою регіо- та стереоселективністю, що є особливо важливим для синтезу складних стероїдних сполук [20].

Відповідно до сучасних уявлень, узагальнених в огляді Song та співавт. (2023), біологічний синтез UDCA включає два основні підходи: ферментативний синтез із використанням очищених ферментів та біотрансформацію за участю цілих клітин мікроорганізмів (whole-cell systems).

Найбільш поширеним біокаталітичним шляхом отримання урсодезоксихолевої кислоти є епімеризація хенодесоксихолевої кислоти за участю каскаду гідроксистероїдних дегідрогеназ [29].

Гідроксистероїдні дегідрогенази (hydroxysteroid dehydrogenases, HSDH) належать до класу оксидоредуктаз і відіграють ключову роль у біокаталітичних перетвореннях жовчних кислот. Ці ферменти характеризуються високою регіо- та стереоспецифічністю і здатні каталізувати оборотні реакції окиснення та відновлення гідроксильних груп у різних положеннях стероїдного ядра. Залежно від положення функціональної групи та просторової орієнтації субстрату розрізняють 3 α -, 7 α -, 7 β - та 12 α -гідроксистероїдні дегідрогенази, кожна з яких виконує специфічну роль у метаболізмі та біосинтезі жовчних кислот [28].

У біокаталітичному синтезі урсодезоксихолевої кислоти визначальне значення мають саме 7 α - та 7 β -HSDH, які діють узгоджено в межах ферментативного каскаду. Такі ферменти, як правило, є кофакторзалежними та використовують NAD⁺/NADH або NADP⁺/NADPH як переносники відновлювальних еквівалентів. У системах з очищеними ферментами регенерація кофакторів потребує додаткових технічних рішень, тоді як у whole-cell системах ця проблема значною мірою вирішується за рахунок внутрішньоклітинного метаболізму [26].

У такій системі 7α -HSDH каталізує селективне окиснення гідроксильної групи в положенні C-7 з утворенням 7-кето-проміжного продукту, після чого 7β -HSDH забезпечує його стереоселективне відновлення з утворенням β -орієнтованої гідроксильної групи, характерної для урсодезоксихолевої кислоти. Схему цього біокаталітичного перетворення наведено на рис 1.6.

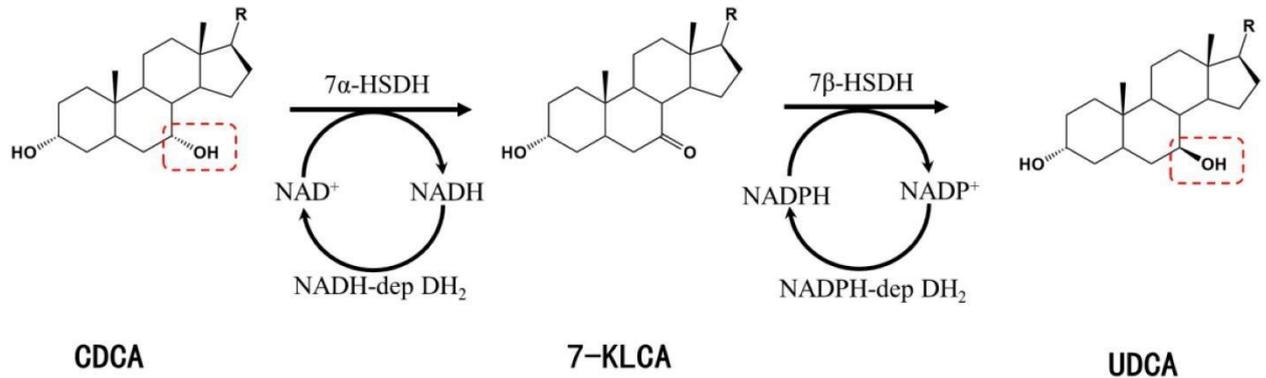


Рис. 1.6. Узагальнена схема біокаталітичного перетворення хенодезоксихолевої кислоти в урсодезоксихолеву кислоту за участю гідроксистероїдних дегідрогеназ [15].

Біокаталітичні методи характеризуються високою селективністю, скороченням кількості технологічних стадій та зниженим екологічним навантаженням. Проте їх промислове впровадження супроводжується низкою технологічних викликів, серед яких ключове місце займають стабільність ферментів, регенерація кофакторів та ефективне очищення реакційних сумішей. Саме проблеми downstream processing, зокрема очищення ферментних лізатів і біокаталітичних систем, значною мірою визначають економічну доцільність використання біокаталізу для синтезу урсодезоксихолевої кислоти [23].

Для узагальнення наведених вище підходів до отримання урсодезоксихолевої кислоти та їх порівняльної оцінки за основними технологічними, екологічними й економічними критеріями доцільно здійснити систематизацію характеристик хімічних, хемоензиматичних і біокаталітичних методів [24, 25]. Порівняльну характеристику основних методів отримання урсодезоксихолевої кислоти наведено в таблиці 1.1.

Порівняльна характеристика методів отримання урсодезоксихолевої кислоти

Критерій порівняння	Хімічні методи	Хемоензиматичні методи	Біокаталітичні (біологічні) методи
Вихідна сировина	Холева кислота, хенодезоксихолева кислота	Холева або хенодезоксихолева кислота	Переважно хенодезоксихолева кислота
Кількість стадій	Висока (6–8 і більше)	Середня (4–6)	Низька (2–3)
Тип каталізу	Хімічний каталіз	Поєднання хімічного та ферментативного каталізу	Ферментативний або клітинний каталіз
Використання ферментів	Відсутнє	Гідроксистероїдні дегідрогенази (HSDH)	7 α -HSDH, 7 β HSDH (free enzyme або whole-cell)
Стереоселективність	Низька–середня	Висока на ферментативних стадіях	Дуже висока
Жорсткі хімічні реагенти	Присутні (CrO ₃ , сильні редуцтанти, органічні розчинники)	Присутні на окремих стадіях	Відсутні
Умови процесу	Жорсткі (високі температури, екстремальні рН)	Комбіновані	М'які (водне середовище, помірні рН і температура)
Екологічне навантаження	Високе	Середнє	Низьке
Складність очищення	Висока (багато побічних продуктів)	Висока–середня	Середня (ферментні лізати, клітинні домішки)

Downstream processing	Орієнтований на хімічні домішки	Комбінований	Критичний етап (очищення біокаталітичних середовищ)
Економічна доцільність	Обмежена	Середня	Потенційно висока при оптимізації
Промислові перспективи	Обмежені	Перехідні технології	Високі
Відповідність принципам «зеленої» хімії	Низька	Середня	Висока
Типові джерела	Tonin & Arends, 2018	Tonin & Arends, 2018; Ferrandi et al., 2020	Ferrandi et al., 2020; Song et al., 2023

Таким чином, аналіз промислових методів отримання урсодезоксихолевої кислоти свідчить про поступовий перехід від традиційних хімічних технологій до більш селективних і екологічно безпечних біокаталітичних підходів. Водночас ефективність таких процесів значною мірою залежить від оптимізації стадій очищення, що обґрунтовує доцільність подальшого дослідження методів очищення біокаталітичних систем, зокрема із застосуванням флокуляції [16].

Висновки до розділу 1

1. Урсодезоксихолева кислота є клінічно значущою жовчною кислотою, ефективність і безпечність якої зумовлені особливостями хімічної будови, зокрема наявністю β -орієнтованої гідроксильної групи в положенні С-7, що визначає її знижену гідрофобність і низьку цитотоксичність порівняно з іншими жовчними кислотами.

2. Амфіфільна природа урсодезоксихолевої кислоти забезпечує її здатність до утворення міцел і змішаних асоціатів у водному середовищі, що лежить в основі фізіологічної дії жовчних кислот та фармакокінетичних властивостей препаратів UDCA.

3. Аналіз промислових методів отримання урсодезоксихолевої кислоти показав, що хімічні методи характеризуються багатостадійністю, низькою селективністю та значним екологічним навантаженням, тоді як хемоензиматичні підходи частково знижують ці недоліки, але не усувають їх повністю. 4. Найбільш перспективним напрямом синтезу урсодезоксихолевої кислоти є біокаталітичні методи з використанням гідроксистероїдних дегідрогеназ, які забезпечують високу регіо- та стереоселективність процесу за м'яких умов і відповідають принципам «зеленої» хімії.

5. Основним обмежувальним фактором промислового впровадження біокаталітичних технологій є складність стадій *downstream processing*, зокрема очищення біокаталітичних реакційних сумішей і ферментних лізатів.

РОЗДІЛ II

ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Мікроорганізми-продуценти гідроксистероїддегідрогеназ: від природних ізолятів до рекомбінантних штамів

Успіх біокаталітичного синтезу урсодезоксихолевої кислоти (UDCA) фундаментально залежить від джерела та властивостей біокаталізатора. Ключову роль у цих процесах відіграють гідроксистероїддегідрогенази (hydroxysteroid dehydrogenases, HSDH), які забезпечують селективні окисновідновні перетворення гідроксильних груп у стероїдному ядрі жовчних кислот.

Хоча HSDH є широко поширеними в природі, їх ефективне промислове використання потребує відповідності продуцента низці критичних вимог, зокрема високої швидкості росту, стабільності ферментів, керованої селективності та можливості ефективного виділення цільового продукту [6].

Еволюція підходів до біокаталітичного синтезу UDCA відбувалася від використання природних мікробних ізолятів до створення генетично модифікованих рекомбінантних систем, що дозволило суттєво підвищити керованість процесу та його промислову привабливість [17].

Природна мікробіота як первинне джерело генів HSDH

Більшість відомих гідроксистероїддегідрогеназ було вперше ідентифіковано у складі кишкової мікробіоти ссавців. Це зумовлено тим, що жовчні кислоти в кишечнику виконують подвійну функцію — з одного боку, є сигнальними молекулами, а з іншого — проявляють антимікробні властивості. У відповідь на цей селективний тиск мікроорганізми еволюційно сформували ферментативні механізми модифікації жовчних кислот, спрямовані на їх детоксикацію та регуляцію власного мікрооточення [19-21].

До основних природних продуцентів HSDH належать:

Анаеробні представники роду *Clostridium*. Види *Clostridium absonum* та *Clostridium limosum* демонструють високу активність 7 α - та 7 β -

гідроксистероїддегідрогеназ. Зокрема, *Clostridium absonum* часто розглядається як еталонний природний біокатализатор для епімеризації хенодезоксихолевої кислоти в урсодезоксихолеву кислоту, що обумовлено високою природною активністю відповідних ферментів [22].

Грампозитивні анаеробні бактерії родів *Eubacterium* та *Ruminococcus*.

Дослідження, зокрема наведені [6], показали, що *Ruminococcus torques* продукує унікальні 7β -HSDH із надзвичайно високою стереоселективністю. Така властивість є критично важливою для запобігання утворенню побічних ізомерів жовчних кислот у процесі біокаталізу [23].

Кишкові бактерії роду *Bacteroides*.

Види *Bacteroides fragilis* та *Bacteroides thetaiotaomicron* здатні продукувати 3α - та 12α -HSDH, які використовуються для глибокої модифікації стероїдного ядра жовчних кислот і є важливими елементами складніших біотрансформаційних маршрутів.

Разом з тим, використання природних мікробних ізолятів має суттєві обмеження для промислової реалізації. Більшість таких мікроорганізмів є облігатними анаеробами, що потребує спеціалізованого обладнання та суворого контролю умов культивування. Крім того, рівень експресії цільових ферментів у природних умовах часто є недостатнім, а наявність інших ферментів метаболізму жовчних кислот призводить до утворення суміші продуктів, що суттєво ускладнює стадії очищення [19, 22].

2.2. Рекombінантні штами як високоефективні біокатализатори

Розвиток методів молекулярної біології та генетичної інженерії зумовив перехід від використання природних продуцентів до створення рекombінантних штамів, у яких гени HSDH «переносять» з вибагливих анаеробних мікроорганізмів у добре вивчені та технологічно зручні хости. Такий підхід дозволяє значно підвищити продуктивність процесу та забезпечити його відтворюваність.

Найбільш поширеною системою експресії гідроксистероїддегідрогеназ

є *Escherichia coli*. Штами *E. coli* BL21(DE3) або JM109 у поєднанні з плазмідними векторами серії pET широко застосовуються для надпродукції HSDH різної специфічності. Використання рекомбінантних систем дозволяє досягати високих концентрацій активного ферменту та значно спрощує масштабування процесу [22].

Суттєвою перевагою рекомбінантних ферментів є можливість оптимізації їх кінетичних параметрів. Наприклад, для рекомбінантної 12 α -HSDH (Cls_12 α HSDH) було показано, що константа Міхаеліса (K_m) для холату становить близько 90 мкМ, що свідчить про високу спорідненість ферменту до субстрату та потенційно високу ефективність біокаталітичного процесу [23].

Важливим аспектом рекомбінантних систем є також **кофакторна залежність**. Можливість цілеспрямованого вибору або модифікації специфічності ферментів до NAD⁺ та NADP⁺, а також інтеграція систем регенерації кофакторів (наприклад, за участю глюкозодегідрогенази), дозволяє суттєво знизити витрати на кофактори та підвищити економічну ефективність процесу [13].

Порівняльну характеристику основних мікроорганізмів-продуцентів гідроксистероїддегідрогеназ, що використовуються в сучасних дослідженнях біокаталітичного синтезу урсодезоксихолевої кислоти, наведено в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Порівняльна характеристика продуцентів гідроксистероїддегідрогеназ

Мікро- організм (джерело генів)	Цільовий фермент	Тип системи	Ключові переваги	Недоліки

<i>Clostridium absonum</i>	7 α -HSDH, 7 β -HSDH	Природний штам	Висока природна активність епімеризації	Складність культивування (анаеробні умови)
<i>Ruminococcus torques</i>	7 β -HSDH	Природний штам	Надзвичайно висока стереоселективність	Повільний ріст біомаси
<i>Escherichia coli</i> (рекомбін ант)	7 α -, 7 β -, 12 α -HSDH	Рекомбінантна система	Висока концентрація ферменту, швидкий ріст	Необхідність руйнування клітин (лізис)
<i>Bacillus subtilis</i>	7 α -HSDH	Рекомбінантна система	Секреція білків у середовище, GRAS-статус	Нижчий рівень експресії порівняно з <i>E. coli</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HSDHкаскад	Дріжджі	Вбудовані системи регенерації кофакторів	Обмеження транспорту жовчних кислот через клітинну стінку

Таким чином, перехід від складних у культивуванні природних анаеробів до рекомбінантних штамів *E. coli* дозволив отримати високоактивні біокаталізатори (наприклад, Cls_12 α HSDH з Kcat/Km понад 2000 мкМ⁻¹·с⁻¹. Проте це створило нові виклики на етапі виділення продукту, пов'язані з високою в'язкістю лізатів та необхідністю відділення великої кількості біомаси. Це обґрунтовує актуальність експериментальної частини роботи, спрямованої на оптимізацію процесу очищення за допомогою флокулянтів [26].

2.3. Об'єкти досліджень

Загальна технологічна схема одержання та очищення ферменту HSDH включає послідовні етапи ферментації рекомбінантних клітин, відокремлення біомаси, руйнування клітин з утворенням клітинного гомогенату, підготовку гомогенату до очищення та хроматографічну очистку цільового ферменту.

функціональних режимів його використання у біокаталітичному синтезі урсодезоксихолевої кислоти.

Таблиця 2.2

Характеристика об'єкта дослідження та функціональних варіантів його використання

Характеристика	Опис
Мікроорганізм	<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)
Тип штаму	Рекомбінантний
Вектор експресії	pET-серії
Експресовані гени	7 α -HSDH, 7 β -HSDH, 12 α -HSDH*
Тип біокаталітичної системи	Whole-cell / клітинний лізат
Роль у процесі	Каталіз окисно-відновних перетворень жовчних кислот
Кофакторна залежність	NAD ⁺ / NADP ⁺
Особливості downstream	Висока концентрація ДНК і білків-господарів, потреба у флокуляції

Спочатку вирощували нічну культуру клітин, яку використовували для подальшої індукції експресії. Надалі з культури клітин отримували надосад культурального середовища, куди експресується синтезований фермент та проводили аналіз його білкового складу методом електрофорезу.

Культивування рекомбінантного штаму *E. coli* BL21(DE3) здійснювали у режимі fed-batch з використанням синтетичного середовища Vasto CD medium (Thermo Fisher Scientific, CAS#A4973702) з подальшим відокремленням клітин шляхом центрифугування на центрифугі Sigma 6-16KS. Контроль параметрів росту здійснювали шляхом регулювання температури, рН та швидкості подачі субстрату. Індукцію експресії проводили при досягненні заданої оптичної густини шляхом додавання IPTG.

Таблиця 2.3

Основні параметри культивування рекомбінантного штаму *E. coli* BL21(DE3)

Параметр	Значення
Тип процесу	Fed-batch
Середовище	Vacto CD
Температура	25 °C
pH	7,0
Швидкість росту μ	0,12 год ⁻¹
Індукція	IPTG
Рівень експресії HSDH	до 6 г/л

Для вивільнення внутрішньоклітинного ферменту клітини руйнували методом високотискової гомогенізації в мікрофлюїд процесорі Microfluidics M-7125 - 20, в результаті чого отримували клітинний гомогенат, що містив цільовий фермент HSDH, клітинні білки, нуклеїнові кислоти та клітинні фрагменти.

Хроматографічна очистка ферменту HSDH здійснюється методом метал-афінної хроматографії. Для хроматографічної очистки цільового ферменту HSDH методом ІМАС використовували систему ÄKTA Pure (GE Healthcare) з використанням колонки XK 16/20 (GE Healthcare), запакованої сорбентом POROS 20 MC (Thermo Fisher Scien), збагаченому катіонами Ni²⁺. Довжина колони 20 см. Аналітичний контроль елюатів після ІМАС-очистки здійснювали за допомогою рідинного хроматографа Shimadzu LC-2040.

Колонка що використовується в даному методі чутлива до наявності колоїдних домішок та високомолекулярних компонентів. Забруднення поверхні сорбенту клітинними фрагментами та нуклеїновими кислотами призводить до підвищення гідродинамічного опору, зниження пропускної здатності та скорочення терміну експлуатації хроматографічних колонок. Наявність у клітинному гомогенаті значної кількості нуклеїнових кислот, клітинних білків та колоїдних домішок може призводити до фулінгу

хроматографічних колонок, зниження їх експлуатаційних характеристик та обмеження кількості робочих циклів.

Для зниження негативного впливу домішок клітинного гомогенату на ефективність хроматографічної очистки до технологічної схеми було включено додаткову стадію підготовки гомогенату яка передбачає флокуляційну обробку з подальшим механічним розділенням (рис.2.2.).

У роботі застосовували полімерний флокулянт ClariSolve® PDADMAC (Merck, CAS#1.37069.1000). З метою оптимізації стадії підготовки гомогенату до очищення досліджували вплив різних концентрацій флокулянту на властивості системи. Оцінка ефективності флокуляційної обробки проводилась за змінами фізико-хімічних характеристик гомогенату та стабільністю подальшої хроматографічної очистки.

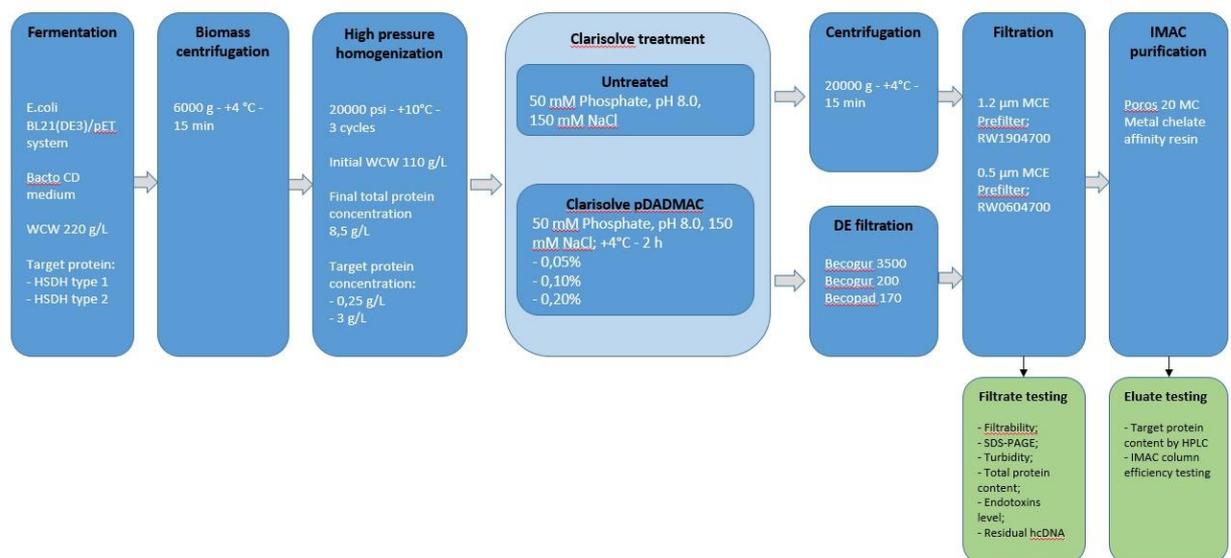


Рис. 2.2. Оптимізована технологічна схема одержання та очищення ферменту HSDH.

Флокуляцію здійснювали у фосфатному буфері з контрольованим значенням рН з додаванням флокулянта у різних концентраціях 0,05%, 0,10% та 0,20%.

Після флокуляційної обробки зразки піддавали центрифугуванню у центрифугі Sigma 6-16KS (20000 g, 4 °C, 15 хв) або механічній фільтрації з

застосуванням кізельгуру Весогур-170, Весогур-200, Весогур-3500 (Eaton Technologies GmbH) як фільтраційної допоміжної речовини. Одержаний фільтрат використовували для подальшої метал-хелатної афінної хроматографії з метою оцінки впливу стадії флокуляції на стабільність та ефективність роботи хроматографічної колонки.

2.4. Методи дослідження:

Для контролю якості зразків на різних стадіях підготовки застосовували аналітичні методи, зокрема визначення мутності, вмісту нуклеїнових кислот та білкових компонентів. Отримані аналітичні дані використовували для порівняльної оцінки зразків до та після флокуляційної обробки та для обґрунтування доцільності застосування обраних методів підготовки клітинного гомогенату до очищення.

Препаративна очистка 7-альфа HSDH методом метал-афінної хроматографії

Рухома фаза А. До 900 мл води Р додають 7,8 г натрій дигідрофосфату дигідрату (Sigma-Aldrich, CAS#04269), 1,7 г імідазолу (Sigma-Aldrich, CAS#56750) та 17,6 г натрій хлориду (Sigma-Aldrich, CAS#S7653), перемішують до повного розчинення компонентів і доводять рН до 8,42 розчином 10 % натрій гідроксиду (Sigma-Aldrich, CAS#655104), після чого об'єм розчину доводять до 1 л водою Р.

Рухома фаза Б. До 900 мл води Р додають 7,8 г натрій дигідрофосфату дигідрату (Sigma-Aldrich, CAS#04269), 17 г імідазолу (Sigma-Aldrich, CAS#56750) та 17,6 г натрій хлориду (Sigma-Aldrich, CAS#S7653), перемішують до повного розчинення компонентів і доводять рН до 8,42 розчином 10 % натрій гідроксиду (Sigma-Aldrich, CAS#655104), після чого об'єм розчину доводять до 1 л водою Р.

10 % розчин натрій гідроксиду. 20 г натрій гідроксиду (Sigma-Aldrich, CAS#655104) розчиняють у 200 мл води Р та охолоджують до кімнатної температури.

Розчин для нанесення на колону. Надосад лізату клітин продуцента розводять удвічі рухомою фазою А з кондуктивністю 34 мС/см. Загальний об'єм нульової точки розділяють на шість частин. Проводять шість послідовних нанесень та шість послідовні елюцій з однаковими параметрами.

Колону врівноважують 178 мл рухомої фази А зі швидкістю потоку 8,4 мл/хв при тиску 0,13 МРа до досягнення параметрів рН 8,5 та електропровідності 34 мС/см. Зразок для нанесення подають у колону зі швидкістю 10 мл/хв в об'ємі 300 мл. Кінцеві параметри після нанесення зразка: електропровідність

19,5 мС/см, рН 7,7, аналітичний сигнал (при довжині хвилі 280 нм) 3100 mAU. Надалі колону промивають від незв'язаних компонентів рухомою фазою А при швидкості потоку 10 мл/хв в об'ємі 94 мл до досягнення кінцевих параметрів електропровідності 34 мС/см, рН 8,5 та аналітичного сигналу 200 mAU.

Елюцію проводять 100 % рухомої фази Б в ізократичному режимі. Цільову фракцію в об'ємі 16 мл відбирають в окрему ємність, керуючись інтенсивністю аналітичного сигналу від 277 mAU до 454 mAU з максимумом поглинання 2280 mAU. Елюати, отримані з шести циклів нанесення, об'єднують, вносять еквівалентний об'єм гліцерину та зберігають при температурному режимі -20 °С.

Визначення оптичної густини.

Ступінь освітлення клітинного гомогенату після флокуляційної обробки визначали за допомогою вимірювання оптичної густини зразків на спектрофотометрі Thermo Scientific Varioskan LUX за довжини хвилі 840 нм. Вимірювання відповідно до відповідно до загальної статті ДФУ 2.2.25 «Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій і видимій областях».

Визначення білка методом Лоурі

Для побудови калібрувальної кривої готують серію розведень стандартного зразка: із стокового розчину BSA (концентрацією 0,21 мг/мл): 210 мкг/мл; 191 мкг/мл; 168 мкг/мл; 147 мкг/мл; 126 мкг/мл; 84 мкг/мл; 42

мкг/мл. Отриманий зразок цільової фракції елюату розводять у 40 разів водою Р. Готують серію розведень для отримання випробуваних розчинів, аналогічно стандартному зразку. У лунки мікропланшету вносять по 100 мкл розведених зразків, до яких додають 100 мкл лужного реактиву міді та інкубують при кімнатній температурі протягом 5 хв. Надалі у лунки вносять по 50 мкл 0,2 N реактива Фоліна (Sigma-Aldrich, CAS#F9252) та інкубують у темряві при кімнатній температурі протягом 15 хв. Абсорбцію реакційної суміші визначають методом УФ/видимої спектрофотометрії при довжині хвилі 750 нм відповідно до загальної статті ДФУ 2.2.25 «Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій і видимій областях». Як бланк використовують воду Р, інкубовану з лужним реактивом міді та реактивом Фоліна. Для обчислення усередненої концентрації загального білка у проміжному продукті використовують програму Excel з побудовою калібрувальної кривої та графіка абсорбції випробуваних розчинів, визначенням вільного члена регресії та тангенса кута нахилу. Загальну кількість білка у зразку визначають з врахуванням концентрації та об'єму.

Визначення концентрації ДНК

Аналіз проводили методом полімеразної ланцюгової реакції з використанням комерційного набору E. coli Host Cell DNA Extraction & Amplification

Kit (Cygnus Technologies, США, CAS#D415T) відповідно до інструкції виробника.

Підготовку та попередній контроль зразків перед ПЛР-аналізом здійснювали з використанням флуориметричної платформи Thermo Scientific LabStudio 5.

Кількісне визначення ДНК проводили методом ПЛР у реальному часі з флуоресцентною детекцією сигналу на приладі QuantStudio 5 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, США).

Виділення ДНК:

Для підготовки зразків до визначення вмісту ДНК розчин протеїнази К готували безпосередньо перед аналізом шляхом розведення у співвідношенні 1:10 у TE-буфері для ДНК (Sigma-Aldrich, CAS № 93283). Для кожного зразка використовували 25 мкл отриманого розчину протеїнази.

Приготування розчинів калібраторів. Відібрати необхідну кількість мікропробірок ємністю 2 мл. Розведення калібраторів готувати за наступною схемою:

№ пробірки	Об'єм концентрату ДНК <i>E. coli</i>	Об'єм розчинника для зразків, мкл	Остаточна концентрація, нг/10 мкл
1	Вихідний концентрат, 500 мкл	н/в	100
2	50 мкл пробірки 1	450	10
3	50 мкл пробірки 2	450	1
4	50 мкл пробірки 3	450	0,1
5	50 мкл пробірки 4	450	0,01
6	50 мкл пробірки 5	450	0,001
7	50 мкл пробірки 6	450	0,0001
8	50 мкл пробірки 7	450	0,00001
9	0 мкл (негативний контроль)	450	0

Приготування розчини зразків та контролів інгібування. Зразки потрібно вдвічі розводити буфером для зразків. Для цього у мікропробірки ємністю 2 мл внести 225 мкл буферу для зразків, додати до них 225 мкл зразків. Для приготування контролю інгібування покроково розвести концентрат ДНК зразком, розведеним буфером для зразків, до концентрації ДНК 0,02 нг/10 мкл.

До всіх калібраторів, зразків та контролів додати 25 мкл розчину протеїнази К. Легко перемішати на вортексі протягом 5с. Інкубувати зразки в твердотільному термостаті чи водяній бані при температурі 60 °С протягом 60 хв. Прибрати краплі конденсату з кришок пробірок шляхом центрифугування 5 с при 10 000 об/хв. Додати до проб 450 мкл буферу для екстракції. Перемішати на вортексі 5 с. Додати до проб 1 мл буферу для преципітації. Перемішати на вортексі 5 с. Інкубувати зразки протягом 5 хв на робочому столі

при кімнатній температурі. Центрифугувати зразки при 10 000 об/хв протягом 10 хв. Злити супернатант, перевернути пробірки і витримати 2-3 хвилини на безворсовій серветці для видалення крапель рідини. Додати 1,5 мл буфера для промивання ДНК у кожному пробірці. Перемішати на вортексі протягом 5 секунд (при цьому осад може залишитися прикріпленим до дна пробірки). Інкубувати на столі протягом 20 хвилин. Під час цієї інкубації зразки необхідно перемішати 1-2 рази.

Центрифугувати зразки при 10 000 об/хв протягом 5 хв. Злити супернатант, перевернути пробірки і витримати 2-3 хвилин на безворсовій серветці для видалення крапель рідини. Прогріти ТЕ-буфер до температури близько 50 °С. Ресуспендувати осад ДНК у 250 мкл попередньо прогрітого ТЕ-буферу.

Перемішати вміст кожної пробірки протягом 5 секунд. Інкубувати при кімнатній температурі протягом 5 хвилин. 1-2 рази протягом інкубації провести повторне перемішування.

Отриманий зразок є розчином високоочищеної ДНК, яка буде в подальшому використовуватись для ампліфікації. Можливе заморожування виділеної ДНК та тривале зберігання при -20 °С.

Ампліфікація ДНК:

Для ампліфікації додатково до праймерів, які входять в склад тест-системи, використовувати мастер-мікс Power SYBR® Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, США, CAS#4368577)

Приготування реакційної суміші для ампліфікації враховуючи кількість аналізованих зразків та об'єм приготованої суміші (15 мкл), необхідної для 1 зразка та 25% надлишку. Щоб приготувати реакційну суміш на один зразок, необхідно до 12,5 мкл мастер-міксу додати 2,5 мкл розчину праймерів, ретельно перемішати. Всі зразки рекомендовано ставити не менше, ніж в трьох повторах.

Відібрати необхідну кількість мікропробірок для ПЛР об'ємом 0,2 мл з оптичними (плоскими) кришками. В кожну пробірку внести 10 мкл виділеної ДНК та 25 мкл приготованої реакційної суміші. Перемішати, уникаючи утворення крапель на кришках. За потреби опустити краплі з кришок шляхом короткочасового центрифугування (5 с).

Скориставшись верхньою частиною штативу для одиничних пробірок, що йде в комплекті з ампліфікатором (синього кольору), завантажити пробірки в прилад. Можливе завантаження пробірок без штативу, але при цьому необхідно врівноважувати їх розташування на приладі таким чином, щоб пробірки розташовувались симетрично вздовж планшета.

Створити схему планшета та програму ампліфікації на ампліфікаторі QuantStudio 5 відповідно внутрішньої інструкції SOPCS000082 «Управління життєвим циклом системи Quant Studio 5» затв.11.02.2025. Запустити цикл ПЛР.

Пропоновані параметри ампліфікації:

1-й цикл: 95° С протягом 10 хвилин.

35-40 циклів: 95 °С протягом 15 секунд, потім 55°С протягом 1 хвилини.

Критерії придатності системи:

- Не повинно спостерігатися ДНК *E. coli* у негативному контролі
- Ефективність ПЛР повинна становити $100 \pm 20\%$
- Контроль виділення ДНК (0,02 нг/10 мкл, розведений випробовуваним зразком) повинен давати 50 – 150% виходу ДНК.

Електрофоретичне розділення білків

Електрофоретичний аналіз білків проводили методом SDS-PAGE. Розділення білків здійснювали у поліакриламідному гелі з подальшим фарбуванням Coomassie Brilliant Blue R-250.

Камера для електрофоретичного розділення білків – Amersham Bioscientific FB3002, джерело струму для електрофоретичного розділення білків – Fisher Scientific – FB3002.

Розділення білків проводять у 12,5 % поліакриламідному гелі. В кишеньки гелю вносять по 5 мкл випробуваних розчинів та розчин білків маркерів молекулярних мас, в об'ємі, рекомендованому виробником. Касету з гелем вставляють в камеру для електрофорезу. У внутрішню та зовнішню електродні відсіки камери заливають робочий буферний розчин для електрофорезу. Приєднують електроди електрофоретичної камери до джерела постійного струму. Вмикають джерело постійного струму. Розділення проводять при силі струму 20мА до моменту, коли лідируючий барвник мігрує до нижнього краю розділяючого гелю. Виявляють білки в гелі фарбуванням забарвлючим розчином кислотного синього Р з наступним знебарвленням знебарвлюючим розчином Р.

1М тріс(гідроксиметил)амінометановий буферний розчин, рН 8,8 Р. В мірну колбу об'ємом 100 мл додають 12,1 г тріс(гідроксиметил)амінометану (Milipore, CAS#1.08387.2500) та 80 мл води очищеної. Наважку розчиняють. рН розчину доводять до 8,8, використовуючи для цього кислоту хлористоводневу концентровану. Об'єм розчину доводять до 100 мл водою Р.

- *Приготування 1М тріс(гідроксиметил)амінометанового буферного розчину рН 6,8 Р.* В мірну колбу об'ємом 100 мл додають 12,1 г тріс(гідроксиметил)амінометану (Milipore, CAS#1.08387.2500) та 80 мл води очищеної. Наважку розчиняють. рН розчину доводять до 6,8, використовуючи для цього кислоту хлористоводневу концентровану. Об'єм розчину доводять до мітки водою Р.

- *Розчин акриламиду-бісакриламиду 30%-ний (29/1) Р.* В мірну колбу об'ємом 100 мл додають 29,0 г акриламиду (Sigma-Aldrich], CAS#A8887) та 1,0 г метиленбісакриламиду (Sigma-Aldrich, M7279). Наважки розчиняють і доводять об'єм розчину до мітки водою очищеною.

- *Розчин 10%-ного натрію додецил сульфату P.* В мірну колбу об'ємом 100 мл додають 10,0 г *натрію додецил сульфату P* (Sigma-Aldrich, CAS#75746). Наважку розчиняють і доводять об'єм розчину до мітки водою очищеною.

- *Розчин 10%-ного амонію персульфату P.* В мірну колбу об'ємом 10 мл додають 1 г *амонію персульфату P* (Sigma-Aldrich, CAS#09913). Наважку розчиняють і доводять об'єм розчину довести до мітки водою очищеною. Розчин розаліквотують у мікропробірки по 0,2 мл. Умови зберігання – при температурі не вищій мінус 20 °С.

- *Робочий буферний розчин для електрофорезу в системі SDSPAGE (TGB-буфер).* В мірну колбу об'ємом 1 л додати 3,03 г *тріс(гідроксиметил)амінометану* (Milipore, CAS#1.08387.2500), 18,76 г *гліцину* (Sigma-Aldrich, G7126), 10 мл 10%-ного розчину *лаурилсульфату*. Наважки розчинити в 500 мл *води P*. Об'єм колби довести до мітки *водою P*.

12,5 % розділяючий гель – 3,1 мл *води P*, 4,2 мл *розчину акриламідубісакриламіду 30% (29/1) P*, 2,5 мл *1M тріс(гідроксиметил)амінометанового буферного розчину, рН 8,8 P*, 0,1 мл *розчину 10%- натрій додецил сульфату P*, 0,1 мл *розчину 10% амоній персульфату P* та 10 мкл *тетраметилетилендіаміну P (ТЕМЕД)* (Merck, CAS# 00024899).

- *Концентруючий гель* – 3,4 мл *води P*, 0,83 мл *розчину акриламідубісакриламіду 30 % (29/1) P*, 0,63 мл *1M тріс(гідроксиметил)амінометанового буферного розчину, рН 8,8 P*, 0,05 мл *розчину 10% натрій додецил сульфату P*, 0,05 мл *розчину 10 % амоній персульфату P* та 5 мкл *тетраметилетилендіаміну P (ТЕМЕД)* (Merck, CAS# 00024899)..

□ *Забарвлюючий розчин кислотного синього.* 2,5 г Coomassie Blue R250 (Sigma-Aldrich, 20278), поміщають у хімічний стакан, вносять 450 мл *води*

очищеної, 450 мл етанолу та 100 мл кислоти оцтової льодяної (SigmaAldrich, 27225 і перемішують на магнітній мішалці до повного розчинення.

Отриманий розчин фільтрують через паперовий фільтр.

РОЗДІЛ III

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1. Аналіз технологічного циклу біокаталітичного виробництва UDCA та стратегії оптимізації Downstream стадій

Промислова реалізація біокаталітичного отримання урсодезоксихолевої кислоти (UDCA) з використанням рекомбінантних систем на основі *Escherichia coli* є багатоетапним процесом, ефективність якого визначається не лише активністю ферментів, а й узгодженістю кожної стадії виділення [7].

Сучасний біотехнологічний процес можна розділити на три критичні блоки:

1. **Стадія ферментації та експресії (Upstream):** На цьому етапі проводиться культивування рекомбінантного штаму-продуцента (наприклад, *E. coli* BL21 з плазмідом, що несе гени 7α - та 7β -HSDH або 12α HSDH). Головним завданням є накопичення максимальної кількості активного розчинного ферменту. Завершується стадія досягненням цільової оптичної густоти (OD_{600}) та індукцією (зазвичай за допомогою IPTG).

2. **Біокаталітична конверсія (Синтез):** Здійснюється або шляхом внесення субстрату безпосередньо у ферментер (whole-cell catalysis), або шляхом використання дезінтегрованої біомаси. Останній варіант є більш поширеним для HSDH, оскільки дозволяє уникнути проблем із транспортом жовчних кислот крізь мембрану клітини, проте він створює значне навантаження на наступні стадії через вихід у розчин усіх компонентів цитозолу.

3. **Первинне очищення та кондиціонування (Downstream Processing).** Саме цей етап є предметом дослідження. Він включає дезінтеграцію клітин, видалення баластних речовин, флокуляцію, центрифугування та фільтрацію [12].

Фізико-хімічні виклики при роботі з рекомбінантними лізатами

Основним технологічним бар'єром є складність розділення фаз «рідина-тверде тіло» після стадії біокаталізу. Використання *E. coli* створює специфічні проблеми:

- **Надлишкова в'язкість через нуклеїнові кислоти:**

Рекомбінантні штами при лізисі вивільняють велику кількість геномної ДНК. Навіть при низьких концентраціях ДНК утворює високов'язкі розчини, що мають псевдопластичні властивості. Це унеможлиблює використання стандартних сепараторів та призводить до швидкої кольматації (забивання) мембранних фільтрів.

- **Колоїдна стабільність суспензії:** Дрібний розмір фрагментів клітинних мембран (менше 1 мкм) та наявність аніонних жовчних кислот, що діють як детергенти, стабілізують систему. Частинки перебувають у стані постійного броунівського руху і не осідають під дією гравітації.

- **Взаємодія "фермент-субстрат" у брудних середовищах:** Присутність протеаз у сирому лізаті може призводити до швидкої деградації рекомбінантних HSDH, тому стадія розділення має бути максимально швидкою.

Для детального розуміння складності розділення реакційного середовища проведено аналіз основних домішок лізату та їхнього впливу на Downstream-процес (див. табл. 3.1). На основі цих даних стає очевидним, що застосування катіонних поліелектролітів є найбільш раціональним підходом для одночасної нейтралізації негативного заряду біомаси та зниження в'язкості, зумовленої нуклеїновими кислотами [28].

Таблиця 3.1.

Аналіз впливу основних домішок лізату на Downstream-процес

Компонент лізату	Фізико-хімічні властивості	Вплив на Downstream стадії	Метод усунення
Клітини та уламки мембран	Негативний заряд, розмір 0,5–2,0 мкм	Висока каламутність, утворення стійких суспензій	Флокуляція катіонними полімерами
Геномна ДНК	Поліаніон, висока молекулярна маса	Різка підвищення в'язкості, забивання мембран фільтрів	Флокуляція (осадження комплексів ПЕІ/ДНК) нуклеази або
Білки господаря (НСР)	Різна ізоелектрична точка, гідрофобність	Забруднення цільового АФІ, піноутворення	Адсорбція на флокулах, хроматографія
Жовчні кислоти (субстрат)	Аніонні ПАР	Стабілізація колоїдів, міцелоутворення	Регулювання рН, осадження

3.2. Флокуляція як метод інтенсифікації технологічного процесу

Застосування флокулянтів безпосередньо перед стадіями центрифугування або фільтрації є стратегічним технологічним рішенням, спрямованим на інтенсифікацію downstream-стадій у біокаталітичному виробництві урсодезоксихолевої кислоти (UDCA). У випадку використання рекомбінантних систем на основі *Escherichia coli* саме стадія первинного освітлення клітинного гомогенату визначає стабільність і відтворюваність подальших операцій мембранної та хроматографічної очистки [10].

Флокуляція дозволяє цілеспрямовано модифікувати фізико-хімічні властивості багатокомпонентної системи клітинного лізату шляхом агрегації

твердих і колоїдних частинок, зниження в'язкості середовища та часткового видалення баластних домішок. На відміну від суто механічних методів освітлення (центрифугування, глибока фільтрація), флокуляція забезпечує комплексний ефект, який реалізується вже на початкових стадіях downstream processing [2].

Механізм покращення технологічних показників:

1. **Агрегація біомаси:** Катіонні флокулянти (наприклад, поліакриламід з високою молекулярною масою) нейтралізують від'ємний заряд клітин та фрагментів ДНК. Утворюються макрофлокули розміром 0,1–1,0 мм, які мають значно вищу швидкість седиментації згідно із законом Стокса.

2. **Очищення від розчинних домішок:** Полімерні ланцюги адсорбують на собі не лише тверді частинки, а й частину розчинних білків-господарів (HCP — host cell proteins), що значно полегшує подальшу хроматографічну очистку.

3. **Збереження виходу продукту:** На відміну від прямої фільтрації, де значна частина UDCA може затримуватися у «фільтрувальному пирозі», флокуляція дозволяє отримати чіткий поділ фаз із мінімальною сорбцією цільової кислоти на осаді.

Економічна та екологічна доцільність оптимізації очищення

З точки зору «зеленої» хімії та біотехнології, правильний підбір флокулянта дозволяє:

- Скоротити час технологічного циклу на 20-30%.
- Зменшити споживання електроенергії центрифугами за рахунок зниження необхідного фактора розділення (G-force).
- Відмовитися від використання дорогих та складних у утилізації фільтрувальних допоміжних засобів (наприклад, діатоміту).

3.3. Оцінка впливу концентрації флокулянта ClariSolve® PDADMAC на підготовку клітинного гомогенату

З метою оптимізації стадії підготовки клітинного гомогенату до подальшої мембранної фільтрації та ІМАС-очистки було проведено серію експериментів із використанням флокулянта ClariSolve® PDADMAC у різних концентраціях: 0,05%, 0,10% та 0,20%. Основну увагу приділяли оцінці впливу концентрації флокулянта на ступінь освітлення гомогенату, збереження цільового білка HSDH, ефективність видалення ДНК та придатність зразків до хроматографічної очистки.

Після флокуляції утворені флокули відокремлювали шляхом центрифугування або діатомової фільтрації з використанням кізельгура.

Дезінтеграт використовували як вихідний необроблений клітинний гомогенат після руйнування клітин. Зразок 0% фугату отримували шляхом попереднього механічного освітлення дезінтеграту (центрифугування) та подальшої фільтрації без додавання флокулянта і застосовували як контроль для оцінки ефективності флокуляційної та фільтраційної обробки. Для дезінтеграту без попередньої обробки стадія фільтрації не проводилась у зв'язку з високим вмістом твердих частинок та колоїдних домішок, що призводило до швидкого забивання фільтра. У зв'язку з цим аналіз даного зразка здійснювали лише до фільтрації з подальшою оцінкою виходу білка відносно вихідного матеріалу.

3.3.1. Вплив флокуляції на збереження білкової фракції клітинного гомогенату

Для оцінки впливу флокуляційної обробки та способу подальшого відокремлення флокул на збереження білкової фракції клітинного гомогенату було визначено концентрацію загального білка у фугатах до та після мембранної фільтрації (0,5 мкм), а також розраховано відносний вихід білка (recovery).

У нефлокульованих зразках (дезінтеграт та 0% фугат) концентрація загального білка залишалася високою і становила близько 11,5–12,0 мг/мл незалежно від проведення мембранної фільтрації. Це свідчить про те, що за відсутності флокуляційної обробки механічні стадії освітлення, зокрема центрифугування та фільтрація, не забезпечують селективного видалення білкових домішок і не знижують білкове навантаження на подальші стадії очищення.

Після флокуляційної обробки із застосуванням ClariSolve® PDADMAC спостерігалось зниження концентрації загального білка у фугаті порівняно з нефлокульованими зразками, що свідчить про залучення частини білкових компонентів до складу флокул. При концентрації флокулянта 0,05% концентрація загального білка після відокремлення флокул шляхом центрифугування становила близько 8,6 мг/мл. Аналогічні значення спостерігалися і після мембранної фільтрації, що вказує на ефективне попереднє освітлення зразка та відсутність додаткових втрат білка на стадії фільтрації.

При використанні кізельгура як альтернативного способу відокремлення флокул за тієї ж концентрації флокулянта (0,05%) концентрація загального білка у фугаті була нижчою і становила приблизно 4,0 мг/мл. Це свідчить про більш інтенсивне видалення білкових компонентів, що, ймовірно, зумовлено неспецифічною адсорбцією білків на поверхні кізельгура або їх механічним захопленням у фільтрувальному шарі.

Подальше підвищення концентрації флокулянта до 0,10% та 0,20% супроводжувалося поступовим зниженням концентрації загального білка у фугатах незалежно від способу відокремлення флокул. При цьому у зразках, де відокремлення здійснювали за допомогою кізельгура, спостерігалися нижчі значення вмісту білка порівняно з відповідними зразками після центрифугування, що вказує на більші втрати білкової фракції.

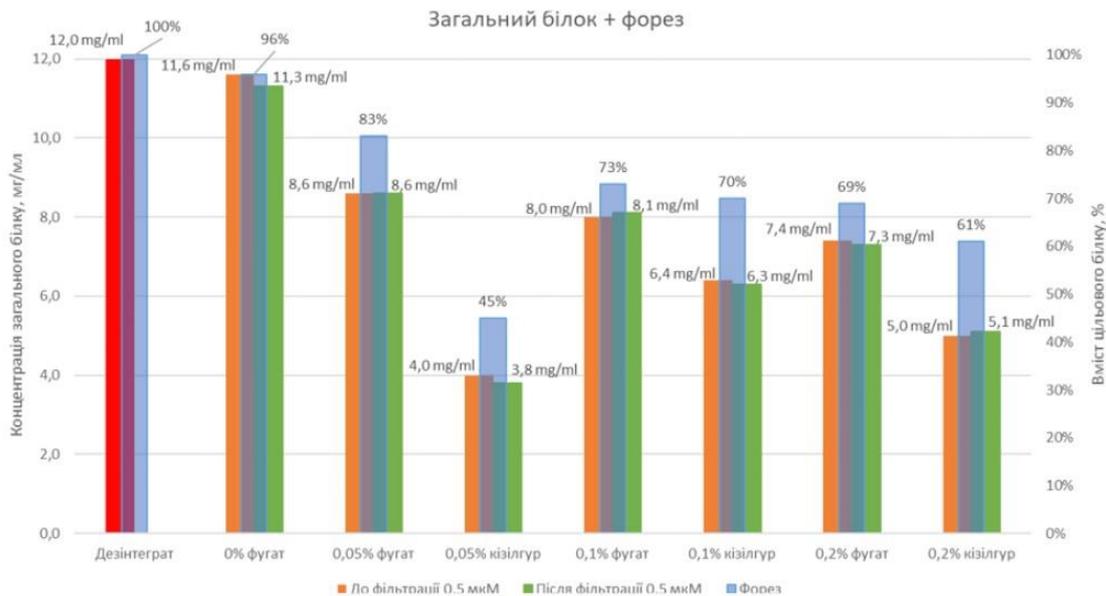


Рис.3.1 Вплив флокуляції на збереження білкової фракції клітинного гомогенату

Таким чином, результати свідчать, що флокуляційна обробка з використанням ClariSolve® PDADMAC ефективно знижує вміст баластних білкових домішок у клітинному гомогенаті. Водночас спосіб відокремлення флокул істотно впливає на вихід білка: центрифугування забезпечує кращу збереженість білкової фракції, тоді як застосування кізельгура призводить до додаткових втрат білка. З огляду на необхідність мінімізації втрат цільового ферменту, використання центрифугування після флокуляційної обробки є більш доцільним для подальших стадій очищення.

3.3.2. Вплив флокуляції на каламутність клітинного гомогенату

Ефективність освітлення зразків оцінювали шляхом вимірювання оптичної густини при довжині хвилі 840 нм (OD_{840}), що відображає вміст колоїдних частинок, клітинних уламків і агрегатів у клітинному гомогенаті..

У нефлокульованих зразках (дезінтеграт і 0% фугат) значення оптичної густини залишалися високими та становили 0,75 і 0,66 відповідно, що свідчить про значну мутність клітинного гомогенату (рис. 3.2). Навіть після мембранної фільтрації значення OD_{840} зменшувалося лише до ~0,26, що вказує на

обмежену ефективність механічних способів освітлення без попередньої флокуляційної обробки.

Застосування флокулянта ClariSolve® PDADMAC у концентрації 0,05 % призводило до суттєвого зниження оптичної густини фугатів. При відокремленні флокул центрифугуванням значення OD_{840} знижувалося до приблизно 0,13 до фільтрації та 0,18 після фільтрації, що свідчить про значне зменшення каламутності порівняно з нефлокульованими зразками. Подальше зниження оптичної густини після фільтрації було незначним, що вказує на ефективне попереднє освітлення зразка на стадії флокуляції.

При використанні кізельгура як способу відокремлення флокул за тієї ж концентрації флокулянта (0,05 %) спостерігалися подібні значення оптичної густини (приблизно 0,06–0,07), що свідчить про високий ступінь освітлення. Різниця між значеннями до та після фільтрації була мінімальною, що вказує на те, що основний ефект зниження каламутності досягається вже на стадії флокуляційної обробки.

Подальше підвищення концентрації флокулянта до 0,10 % і 0,20 % призводило до ще більшого зниження оптичної густини незалежно від способу відокремлення флокул. Для обох шляхів (центрифугування та кізельгур) значення OD_{840} наближалися до 0,03–0,05, що відповідає практично прозорим розчинам, порівнянним з контрольним чистим розчином води Р. При цьому відмінності між центрифугуванням і кізельгуром за показником мутності були незначними.

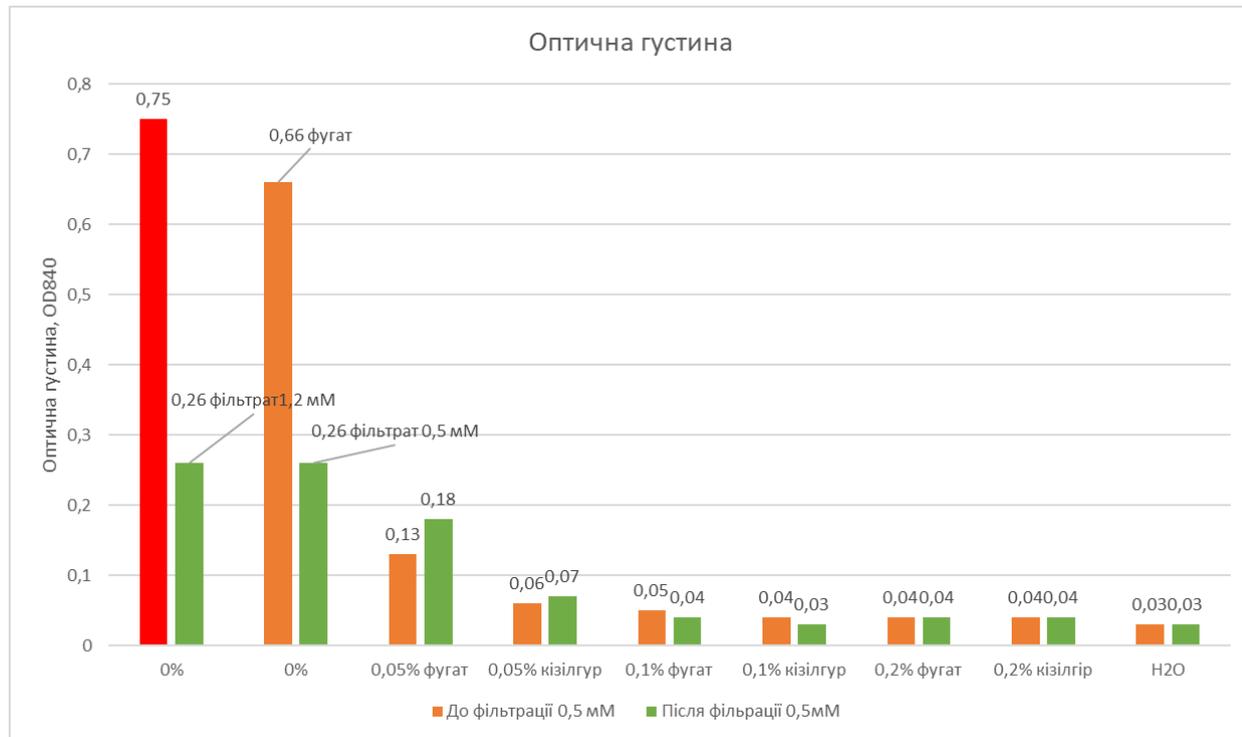


Рис.3.2 Вплив флокуляції на каламутність клітинного гомогенату

Таким чином, вимірювання каламутності показали, що флокуляційна обробка з використанням ClariSolve® PDADMAC є ключовим чинником зниження мутності клітинного гомогенату. Основний ефект досягається на стадії флокуляції, тоді як механічні способи відокремлення флокул (центрифугування або діатомова фільтрація з кізельгуром) забезпечують подібний ступінь остаточного освітлення зразків.

3.3.3. Редукція ДНК у процесі флокуляційної обробки

Одним із найважливіших параметрів для подальшої хроматографічної очистки є вміст нуклеїнових кислот, оскільки ДНК значно підвищує в'язкість розчину та сприяє фулінгу сорбенту.

Для оцінки ефективності флокуляційної обробки щодо видалення нуклеїнових кислот визначали концентрацію залишкової ДНК клітин-хазяїв *Escherichia coli* у клітинному гомогенаті та фугатах після різних варіантів обробки.

У вихідному клітинному гомогенаті (дезінтеграт) концентрація ДНК клітин-хазяїв була високою і становила близько $1,66 \times 10^6$ нг/мл (рис. 3.3). Аналогічні значення спостерігалися у нефлокульованому фугаті (0%), що

свідчить про те, що механічні стадії підготовки зразка без флокуляції не забезпечують ефективного видалення ДНК.

Застосування флокулянта ClariSolve® PDADMAC у концентрації 0,05% призводило до суттєвого зниження концентрації ДНК. Після відокремлення флокул центрифугуванням рівень ДНК зменшувався до приблизно $1,41 \times 10^4$ нг/мл, а при використанні кізельгура — до $2,92 \times 10^3$ нг/мл. Це свідчить про ефективне залучення нуклеїнових кислот до складу флокул та їх подальше видалення зі зразка.

Подальше підвищення концентрації флокулянта до 0,10% та 0,20% забезпечувало практично повне видалення ДНК клітин-хазяїв незалежно від способу відокремлення флокул. У цих зразках концентрація ДНК знижувалася до рівня ≤ 2 нг/мл, що знаходиться нижче межі кількісного визначення методу.

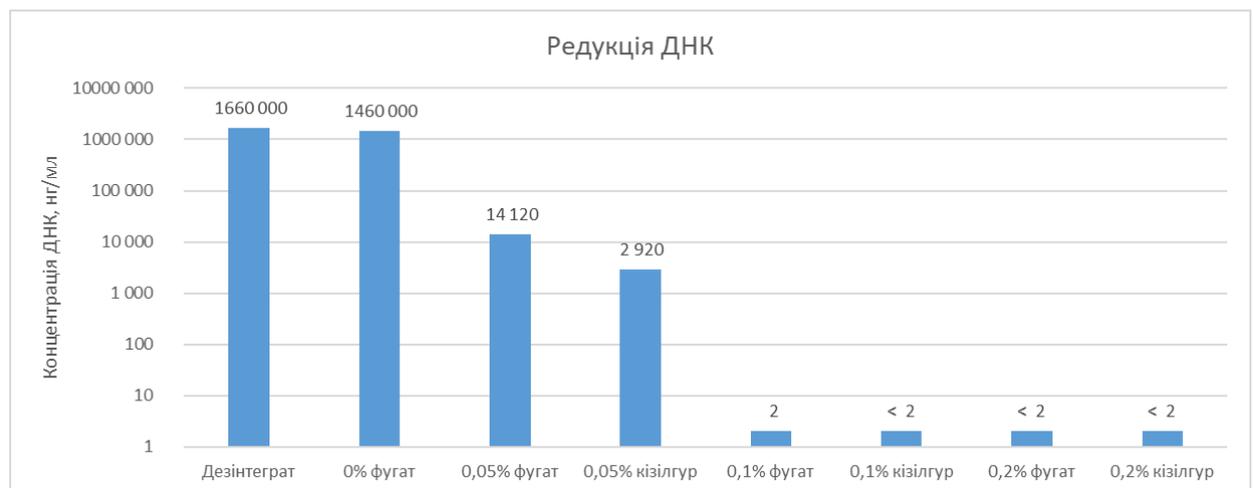


Рис.3.3 Редукція ДНК у процесі флокуляційної обробки

Таким чином, флокуляційна обробка з використанням ClariSolve® PDADMAC є високоефективною щодо видалення ДНК клітин-хазяїв *E. coli*. Оптимальні концентрації флокулянта ($\geq 0,10\%$) забезпечують практично повну редукцію нуклеїнових кислот, що є критично важливим для зниження навантаження на подальші стадії хроматографічного очищення та відповідності вимогам до біотехнологічних продуктів.

3.3.4. Аналіз білкового складу методом SDS-PAGE

Для оцінки впливу флокуляційної обробки на білковий склад клітинного гомогенату та збереження цільового ферменту проводили електрофоретичний аналіз методом SDS-PAGE.

Електрофоретичний аналіз показав, що у всіх досліджених зразках після флокуляційної обробки зберігається смуга, що відповідає цільовому ферменту HSDH (рис. 3.4), що свідчить про відсутність повної втрати ферменту на стадії освітлення. Водночас інтенсивність смуги HSDH відрізнялася залежно від концентрації флокулянта, що вказує на можливі відмінності у збереженні білкової фракції.

При концентрації флокулянта 0,05% спостерігалось часткове зменшення кількості супутніх білкових фракцій за збереження інтенсивності смуги HSDH. При підвищенні концентрації флокулянта до 0,20% у окремих зразках відмічалось ослаблення інтенсивності смуги цільового білка, що може бути пов'язано з неспецифічним коосадженням частини ферменту разом із флокулянтами.

Для концентрації 0,10% характерною була наявність чіткої смуги HSDH без ознак деградації та з меншою варіабельністю між зразками порівняно з іншими концентраціями. Це свідчить про більш збалансовані умови флокуляційної обробки з точки зору збереження цільового ферменту.

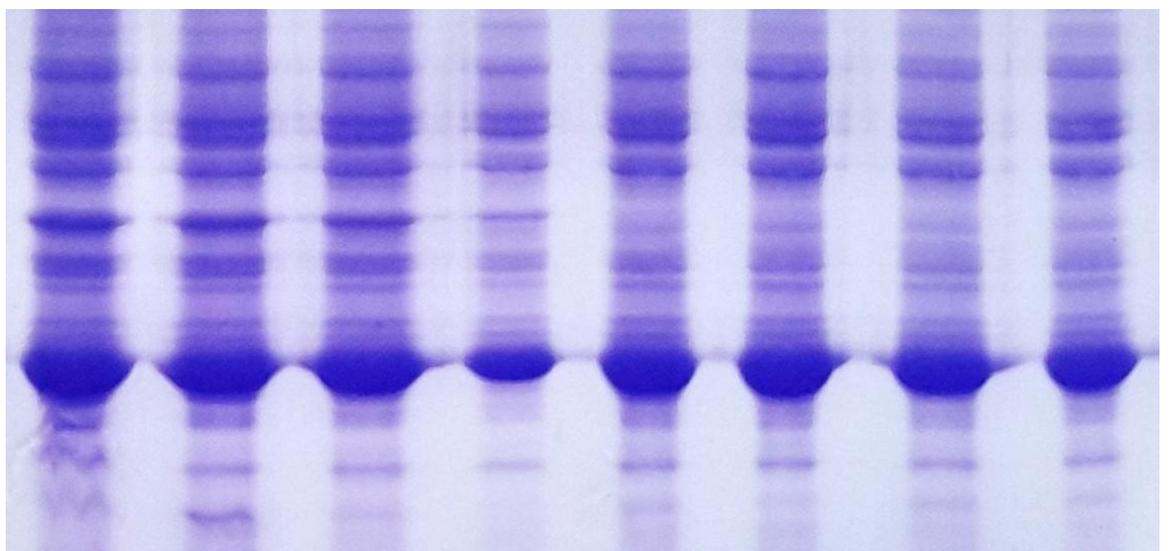


Рис.3.4 Аналіз білкового складу методом SDS-PAGE

Таким чином, результати SDS-PAGE підтверджують, що надмірна концентрація флокулянта може призводити до небажаних втрат білкової фракції, тоді як концентрація 0,10% забезпечує компроміс між ефективним видаленням домішок та збереженням цільового ферменту.

3.3.5. Вибір оптимальної концентрації флокулянта

Вибір оптимальної концентрації флокулянта ClariSolve® PDADMAC здійснювали на основі комплексної оцінки впливу флокуляційної обробки на ключові параметри підготовки клітинного гомогенату до подальших стадій мембранної фільтрації та ІМАС-хроматографії. До таких параметрів належали ступінь освітлення гомогенату, ефективність видалення ДНК клітин-хазяїв, збереження білкової фракції та мінімізація втрат цільового ферменту HSDH.

Результати визначення загального білка показали, що при концентрації флокулянта 0,05% досягається помірне зниження вмісту білкових домішок без істотних втрат білка. Водночас подальше підвищення концентрації до 0,20% супроводжувалося більш вираженим зменшенням концентрації загального білка у фугатах, що свідчить про неспецифічне коосадження білкових компонентів і підвищений ризик втрат цільового продукту.

Аналіз каламутності клітинного гомогенату показав, що ефективно освітлення зразків досягається вже при концентрації флокулянта 0,05%. При цьому при концентраціях 0,10% та 0,20% значення оптичної густини (OD840) знижувалися до рівнів, характерних для практично прозорих розчинів, а різниця між цими двома концентраціями була мінімальною. Це свідчить про досягнення граничного ефекту освітлення при концентрації 0,10%.

Найбільш критичним показником з точки зору подальшої хроматографічної очистки є вміст нуклеїнових кислот. Показано, що при концентрації флокулянта 0,05% відбувається значне зниження концентрації ДНК, однак залишковий її рівень може потенційно впливати на стабільність роботи хроматографічної колонки. Натомість при концентраціях 0,10% та

0,20% забезпечується практично повна редукція ДНК клітин-хазяїв до рівня ≤ 2 нг/мл, що знаходиться нижче межі кількісного визначення методу.

Результати електрофоретичного аналізу методом SDS-PAGE показали, що у всіх досліджених зразках зберігається смуга, що відповідає цільовому ферменту HSDH. Водночас при концентрації флокулянта 0,20% у частині зразків спостерігалось ослаблення інтенсивності смуги HSDH, що може бути пов'язано з неспецифічним коосадженням частини ферменту разом із флокулянтами. Для концентрації 0,10% характерною була наявність чіткої смуги HSDH без ознак деградації та з меншою варіабельністю між зразками, що свідчить про більш збалансовані умови флокуляційної обробки.

Таким чином, концентрація флокулянта ClariSolve® PDADMAC 0,10% є оптимальною, оскільки забезпечує ефективне освітлення клітинного гомогенату, практично повне видалення ДНК клітин-хазяїв та прийнятний рівень збереження цільового ферменту без ризику надмірних втрат. Саме ця концентрація забезпечує оптимальний баланс між ефективністю флокуляції та технологічною придатністю зразків до подальших стадій мембранної фільтрації та ІМАС-хроматографії.

Для узагальнення експериментальних даних та комплексної оцінки впливу концентрації флокулянта ClariSolve® PDADMAC на підготовку клітинного гомогенату до подальших стадій очищення було сформовано порівняльну характеристику основних технологічно значущих показників (табл.

3.2). Аналіз наведених даних дозволяє наочно оцінити компроміс між ефективністю видалення домішок та збереженням цільового ферменту HSDH.

Таблиця 3.2

Порівняльна характеристика впливу концентрації флокулянта ClariSolve® PDADMAC на ключові параметри підготовки клітинного гомогенату

Концентрація флокулянта, %	Концентрація загального білка у фугаті, мг/мл	Відносний вихід білка	OD₈₄₀ після флокуляції	Залишок ДНК, нг/мл	Вплив на збереження HSDH (SDSPAGE)	Технологічна оцінка
0 (без флокуляції)	11,5–12,0	≈100 %	0,66–0,75	~1,66×10 ⁶	Смуга HSDH присутня, багато домішок	Непридатний до хроматографії
0,05	~8,6 (центриф.) / ~4,0 (кізельг ур)	Високий	0,06–0,18	10 ³ –10 ⁴	HSDH збережений, мінімальні втрати	Частково оптимальний
0,10	5,0–6,5	Оптимальний	0,03–0,05	≤2	Чітка смуга HSDH, без деградації	Оптимальний режим
0,20	<5,0	Знижений	0,03–0,04	≤2	Ослаблення смуги HSDH у частині зразків	Надмірна флокуляція

Узагальнення результатів, наведених у таблиці 3.2, підтверджує, що концентрація флокулянта 0,10 % забезпечує оптимальне поєднання високого ступеня освітлення клітинного гомогенату, практично повної редукції ДНК клітин-хазяїв та задовільного рівня збереження цільового ферменту. Саме за цих умов клітинний гомогенат є технологічно придатним до багатоциклової ІМАС-хроматографії без ризику фулінгу сорбенту.

3.4. Оцінка вплив флокуляційної обробки на стабільність хроматографічної очистки

Одним із ключових критеріїв технологічної доцільності застосування флокуляційної обробки є її вплив на стабільність і відтворюваність подальшої хроматографічної очистки. Для рекомбінантних білків, що отримуються з клітинних лізатів *Escherichia coli*, саме стадія первинної підготовки зразка визначає інтенсивність фулінгу сорбенту, зростання гідродинамічного опору та кількість ефективних робочих циклів хроматографічної колонки.

З метою оцінки практичного ефекту флокуляційної стадії було проведено порівняльний аналіз роботи метал-хелатної афінної хроматографічної колонки при очистці ферменту HSDH із:

- необробленого клітинного гомогенату;
- клітинного гомогенату після флокуляційної обробки з використанням 0,10 % ClariSolve® PDADMAC.

Оцінку стабільності хроматографічної системи здійснювали за такими показниками:

- характер і відтворюваність профілю елюції;
- зміна робочого тиску в системі;
- збереження форми піків цільового ферменту;
- кількість стабільних циклів очистки без ознак деградації сорбенту.

У випадку очищення необробленого гомогенату (рис. 3.5А) спостерігалось швидке погіршення хроматографічного профілю вже протягом перших 1–3 циклів. Зокрема, відмічалось зростання тиску в системі, що свідчить про накопичення високомолекулярних домішок і колоїдних частинок у міжзерновому просторі сорбенту. Паралельно з цим відбувалося погіршення форми хроматографічних піків, зниження їх симетрії та розширення, що ускладнювало коректне фракціонування цільового ферменту. Сукупність цих ознак вказує на розвиток процесів фулінгу сорбенту, зумовлених присутністю

нуклеїнових кислот, клітинних фрагментів і білків-господарів у необробленому лізаті.

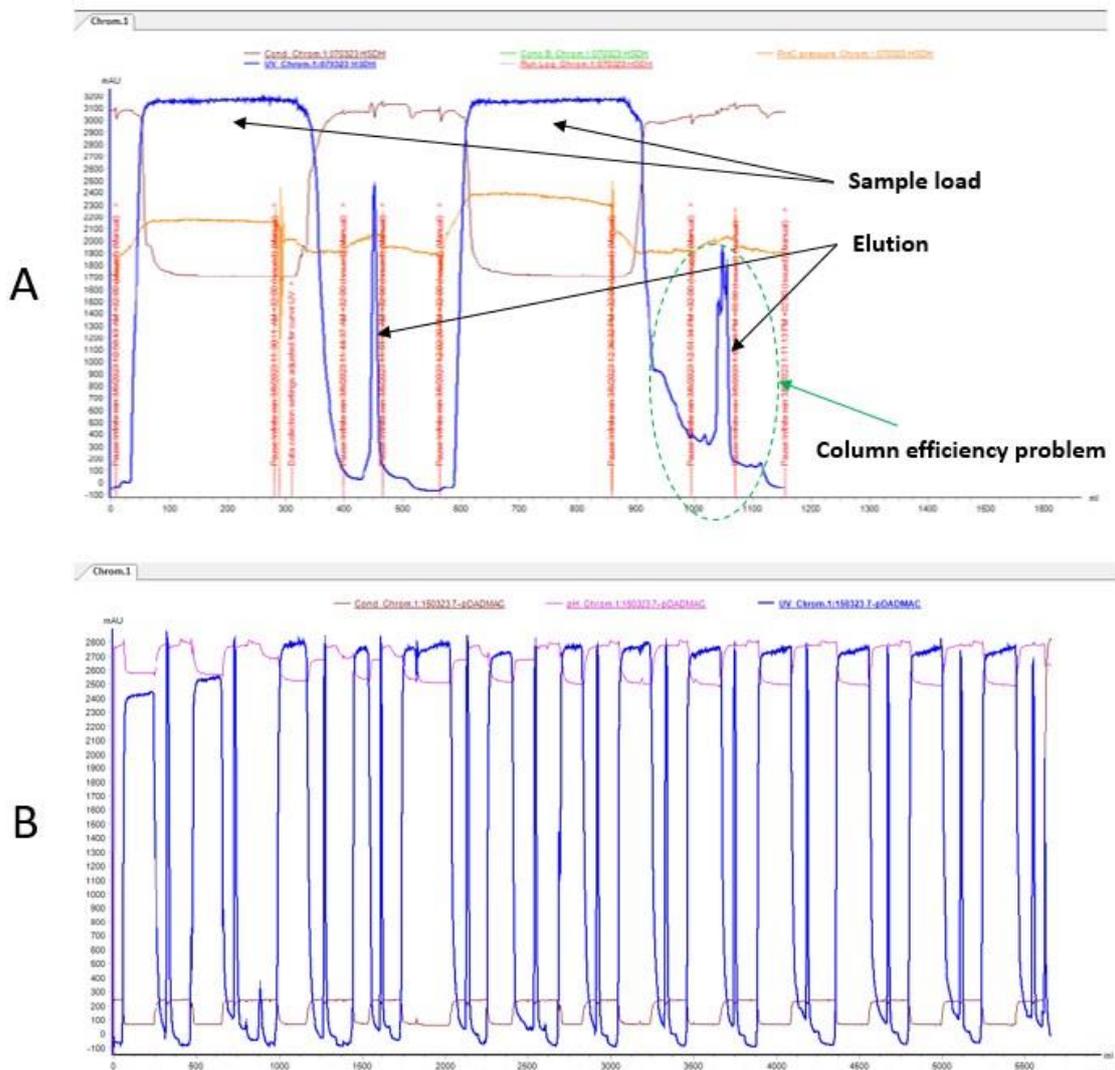


Рис.3.5 Вплив флокуляційної обробки на стабільність хроматографічної очистки

На відміну від цього, при використанні клітинного гомогенату, попередньо обробленого 0,10 % флокулянтном ClariSolve® PDADMAC, хроматографічна система демонструвала стабільну та відтворювану роботу протягом щонайменше 10 послідовних циклів очистки (рис. 3.5, Б). Профілі елюції залишалися практично незмінними, форма піків цільового ферменту HSDH була симетричною, а зростання робочого тиску в системі не спостерігалось. Це свідчить про ефективне зниження навантаження на сорбент завдяки попередньому видаленню колоїдних домішок і нуклеїнових кислот на стадії флокуляції.

Отримані результати узгоджуються з даними щодо редукції ДНК та зниження каламутності клітинного гомогенату, наведеними в пунктах 3.2.2 та 3.2.3. Практично повне видалення нуклеїнових кислот при концентрації флокулянта 0,10 % забезпечує істотне зниження в'язкості розчину та усуває основну причину швидкого фулінгу хроматографічного сорбенту. Крім того, зменшення вмісту баластних білків-господарів знижує ймовірність їх неспецифічної адсорбції на поверхні сорбенту.

Таким чином, флокуляційна обробка клітинного гомогенату з використанням 0,10 % ClariSolve® PDADMAC є ефективним інструментом інтенсифікації downstream-процесу. Вона забезпечує не лише покращення фізико-хімічних властивостей зразка, а й принципово підвищує стабільність і ресурс хроматографічної колонки. Це, у свою чергу, створює передумови для масштабування процесу очистки ферменту HSDH, зменшення експлуатаційних витрат та підвищення економічної ефективності біокаталітичного виробництва урсодезоксихолевої кислоти.

Висновки до розділу 3

1. Проаналізовано технологічний цикл біокаталітичного отримання урсодезоксихолевої кислоти з використанням рекомбінантних клітин *Escherichia coli* з ідентифікацією критичних downstream-стадій.
2. Встановлено, що основними технологічними обмеженнями downstream-процесу є висока каламутність, підвищена в'язкість середовища та значний вміст нуклеїнових кислот у клітинному гомогенаті.
3. Обґрунтовано доцільність застосування флокуляції як інструменту інтенсифікації первинної очистки рекомбінантних лізатів перед мембранною фільтрацією та ІМАС-хроматографією.
4. Показано, що флокуляційна обробка з використанням ClariSolve® PDADMAC забезпечує ефективне зниження каламутності клітинного гомогенату незалежно від способу механічного відокремлення флокул.

5. Виявлено, що центрифугування після флокуляції забезпечує кращу збереженість білкової фракції порівняно з діатомовою фільтрацією з використанням кізельгура.

6. Доведено, що флокуляція є високоефективною щодо редукції ДНК клітин-хазяїв *E. coli*, а при концентрації флокулянта $\geq 0,10$ % забезпечує практично повне видалення нуклеїнових кислот.

7. Підтверджено, що за оптимальних умов флокуляції зберігається цільовий фермент HSDH без ознак деградації, що підтверджено методом SDS-PAGE.

8. Визначено, що концентрація флокулянта ClariSolve® PDADMAC 0,10 % є оптимальною з точки зору балансу між ефективним видаленням домішок та мінімізацією втрат цільового ферменту.

9. Продемонстровано, що попередня флокуляційна обробка клітинного гомогенату забезпечує стабільну роботу ІМАС-хроматографічної колонки протягом щонайменше 10 послідовних циклів очистки.

10. Показано, що включення стадії флокуляції суттєво знижує ризик фулінгу сорбенту та підвищує відтворюваність і технологічну надійність біокаталітичного процесу.

ВИСНОВКИ

1. Проаналізовано хімічні, хемоензиматичні та біокаталітичні методи отримання урсодезоксихолевої кислоти та показано переваги біокаталітичних підходів з точки зору селективності, екологічності та технологічної доцільності.

2. Встановлено, що ключовим обмежувальним фактором промислової реалізації біокаталітичного синтезу UDCA є ефективність downstream-стадій, зокрема первинної очистки рекомбінантних лізатів.

3. Охарактеризовано об'єкт дослідження — рекомбінантний штам *Escherichia coli* BL21(DE3), що експресує гідроксистероїдні дегідрогенази, та визначено його роль у біокаталітичних перетвореннях жовчних кислот.

4. Показано, що клітинний гомогенат після дезінтеграції характеризується високою каламутністю, підвищеною в'язкістю та значним вмістом ДНК, що ускладнює подальшу мембранну та хроматографічну очистку.

5. Обґрунтовано доцільність включення стадії флокуляційної обробки до технологічної схеми підготовки клітинного гомогенату.

6. Доведено, що застосування катіонного флокулянта ClariSolve® PDADMAC забезпечує ефективне освітлення клітинного гомогенату, редукцію нуклеїнових кислот та зниження білкового навантаження на наступні стадії очищення.

7. Визначено, що оптимальною концентрацією флокулянта є 0,10 %, яка забезпечує практично повне видалення ДНК клітин-хазяїв, прийнятний рівень збереження цільового ферменту та стабільність білкового складу.

8. Підтверджено, що флокуляційна обробка не призводить до деградації цільового ферменту HSDH, що встановлено методом SDS-PAGE.

9. Продемонстровано, що попередня флокуляція клітинного гомогенату суттєво підвищує стабільність роботи ІМАС-хроматографічної колонки та запобігає фулінгу сорбенту.

10. Показано, що впровадження флокуляційної стадії дозволяє забезпечити відтворюваність процесу очистки ферменту HSDH протягом багаторазових циклів та підвищити загальну технологічну надійність біокаталітичного процесу.

11. Обґрунтовано, що запропонований підхід може бути використаний для масштабування біокаталітичного синтезу урсодезоксихолевої кислоти та адаптований до інших ферментативних процесів із використанням рекомбінантних систем.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ

1. Engineering the third wave of biocatalysis / U. T. Bornscheuer et al. *Nature*. 2012. Vol. 485, № 7397. P. 185–194. DOI: 10.1038/nature11117.
2. Buyel J. F., Fischer R. Downstream processing of biopharmaceutical proteins produced in plants: the pros and cons of flocculants. *Bioengineered*. 2014. Vol. 5, № 2. P. 138–142. DOI: 10.4161/bioe.2806.
3. Ursodeoxycholic acid and liver disease associated with cystic fibrosis: A multicenter cohort study / C. Colombo et al. *J. Cyst. Fibros.* 2022. Vol. 21, № 2. P. 220–226. DOI: 10.1016/j.jcf.2021.03.014.
4. Ursodeoxycholic acid therapy in pediatric primary sclerosing cholangitis: predictors of gamma glutamyltransferase normalization and favorable clinical course / M. Deneau et al. *J. Pediatr.* 2019. Vol. 209. P. 92–96. DOI: 10.1016/j.jpeds.2019.01.039.
5. Efficient production of ursodeoxycholic acid via a deep eutectic solvent-enabled 7 α - and 7 β -hydroxysteroid dehydrogenase cascade system with enhanced solubility of 7-keto-lithocholic acid. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2026. Vol. 337, Pt. 2. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2025.149510.
6. Eggert T., Bakonyi D., Hummel W. Enzymatic routes for the synthesis of ursodeoxycholic acid. *Journal of biotechnology*. 2014. Vol. 191. P. 11–21. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.08.006.
7. Guajardo N., Schrebler R. A. Upstream and Downstream Bioprocessing in Enzyme Technology. *Pharmaceutics*. 2024. Vol. 16, № 1. P. 38. DOI: 10.3390/pharmaceutics16010038.
8. Hofmann A. F., Hagey L. R. Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cellular and molecular life sciences*. 2008. Vol. 65, № 16. P. 2461–2483. DOI: 10.1007/s00018-008-7568-6.
9. Huang F. Ursodeoxycholic acid as a potential alternative therapeutic approach for neurodegenerative disorders: Effects on cell apoptosis, oxidative stress

and inflammation in the brain. *Brain Behav. Immun. Health.* 2021. Vol. 18. P. 100348. DOI: 10.1016/j.bbih.2021.100348.

10. Van Alstine J. M., Jagschies G., Łacki K. M. Chapter 11 – Alternative Separation Methods: Flocculation and Precipitation. *Biopharmaceutical Processing.* 2018. P. 221–239. DOI: 10.1016/B978-0-08-100623-8.00011-6.

11. Recent Progress in Steroid Synthesis Triggered by the Emergence of New Catalytic Methods / H. R. Khatri et al. *European J. Org. Chem.* 2020. Vol. 7. P. 755–776.

12. Kruschitz A., Nidetzky B. Downstream processing technologies in the biocatalytic production of oligosaccharides. *Biotechnol. Adv.* 2020. Vol. 43. P. 107568. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2020.107568.

13. Lee Y. S., Gerulskis R., Minter S. D. Advances in electrochemical cofactor regeneration: enzymatic and non-enzymatic approaches. *Current Opinion in Biotechnology.* 2022. Vol. 73. P. 14–21. DOI: 10.1016/j.copbio.2021.06.013.

14. Advances in pharmacological activities, biosynthesis and structural modification of ursodeoxycholic acid / P. Li et al. *Drug Design, Development and Therapy.* 2025. Vol. 19. P. 1–18. DOI: 10.2147/DDDT.S557300.

15. Engineering of a hydroxysteroid dehydrogenase with simultaneous enhancement in activity and thermostability for efficient biosynthesis of ursodeoxycholic acid / Y. Li et al. *Appl. Environ. Microbiol.* 2024. Vol. 90, № 9. P. e0123724.

DOI: 10.1128/aem.01237-24.

16. Sustainable and Robust Closed-Loop Enzymatic Platform for Continuous/Semi-continuous Synthesis of Ursodeoxycholic Acid / H.-P. Li et al. *ACS Sustainable Chemistry Engineering.* 2022. Vol. 10, Iss. 50. DOI: 10.1021/acssuschemeng.2c05741.

17. Two-step enzymatic synthesis of ursodeoxycholic acid with a new 7 β hydroxysteroid dehydrogenase from *Ruminococcus torques* / M.-M. Zheng et al. *Process Biochemistry.* 2015. Vol. 50, Iss. 4. P. 598–604. DOI:

10.1016/j.procbio.2014.12.026.

18. Bile acids and their derivatives as potential modifiers of drug release and pharmacokinetic profiles / N. Pavlović et al. *Frontiers in Pharmacology*. 2018. Vol. 9. P. 1283. DOI: 10.3389/fphar.2018.01283.

19. Shah S. A. A., Ultanultan S. S., Adnan H. S. A Whole-cell Biocatalysis Application of Steroidal Drugs. *Orient. J. Chem.* 2013. Vol. 29, № 2. URL: <http://www.orientjchem.org/?p=22040> (Date of access: 25.11.2025).

20. Biological synthesis of ursodeoxycholic acid / P. Song et al. *Frontiers in Microbiology*. 2023. Vol. 14. P. 1140662. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1140662.

21. Tonin F., Arends I. W. C. E. Latest development in the synthesis of ursodeoxycholic acid (UDCA): a critical review. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. 2018. Vol. 14. P. 470–483. DOI: 10.3762/bjoc.14.33.

22. Enzymatic Synthesis of New Acetoacetate-Ursodeoxycholic Acid Hybrids as Potential Therapeutic Agents and Useful Synthetic Scaffolds as Well / V.

Venturi et al. *Molecules*. 2024. Vol. 29, № 6. P. 1305. DOI: 10.3390/molecules29061305.

23. Machine-Learning-Guided Engineering of an NADH-Dependent 7 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase for Economic Synthesis of Ursodeoxycholic Acid /

M. Q. Wang et al. *J. Agric. Food Chem.* 2023. Vol. 71, № 49. P. 19672–19681. DOI: 10.1021/acs.jafc.3c06339.

24. Cofactor-dependence alteration of 7 β -hydroxysteroid dehydrogenase: Enhancing one-pot synthesis efficiency of chenodeoxycholic acid to ursodeoxycholic acid through cofactor self-recycling / X. Xie et al. *Int. J. Biol. Macromol.*

2024. Vol. 280, Pt. 1. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2024.136328.

25. Enhancing ursodeoxycholic acid synthesis: Overcoming multi-step reaction barriers with a cofactor self-cycling cascade system / X. Xie et al. *Molecular Catalysis*. 2025. Vol. 583. P. 115219. DOI: 10.1016/j.mcat.2025.115219.

26. Clean enzymatic production of ursodeoxycholic acid enabled by a newly identified NADH-dependent 7 β -hydroxysteroid dehydrogenase / B. Y. Yang et al. *Molecular Catalysis*. 2023. Vol. 537. DOI: 10.1016/j.mcat.2023.112946.

27. High Enantioselective and Large-Scale Production of Ursodeoxycholic Acid by Combination of Pd- and Hydroxysteroid Dehydrogenase-Catalyzed Hydrogenation / C. L. Zeng et al. *Organic Process Research Development*. 2024. Vol. 28, № 4. P. 1260–1268.

28. Cost-effective whole-cell biosynthesis of ursodeoxycholic acid using engineered *Escherichia coli* with a multienzyme cascade / X. Zhang et al. *Frontiers in microbiology*. 2025. Vol. 16. P. 1538237. DOI: 10.3389/fmicb.2025.1538237.

29. Enzymatic synthesis of ursodeoxycholic acid by a whole-cell biocatalyst with an NADPH regeneration system / Y. G. Zheng et al. *Journal of Biotechnology*. 2017. Vol. 241. P. 12–18. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.11.009.

30. Журавльова Л. В., Огнева О. В. Сфера використання урсодезоксихолевої кислоти при гастроентерологічній патології. *Сучасна гастроентерологія*. 2019. № 2. С. 66–71.

31. Просоленко К. О. Роль і місце препаратів урсодезоксихолевої кислоти у схемах лікування захворювань гепатобіліопанкреатичної зони, асоційованих з метаболічним синдромом. *Вісник клубу панкреатологів*. 2022. № 2-3. С. 36–45.

ДОДАТОК

Публікації за темою роботи

Секція 6
«СУЧАСНА БІОТЕХНОЛОГІЯ»

міосателітоцити завдяки їхній детермінованості до міогенезу. Однак для промислового масштабування перспективним є використання індукованих плюрипотентних стовбурових клітин (iPSC) через їхню здатність до необмеженого самооновлення. Для повноцінної імітації м'яса необхідне ко-культивування міоцитів з адипоцитами, що забезпечує формування мармурової текстури та відповідного ліпідного профілю продукту.

Значна увага приділяється розробці безсироваткових культуральних середовищ (serum-free media), оскільки використання фетальної бичачої сироватки (FBS) є етично неприйнятним та несе ризики контамінації. Актуальним є заміщення компонентів тваринного походження рекомбінантними факторами росту або їхніми рослинними аналогами.

Ключовим елементом формування структури є скафолди (тривимірні пористі каркаси). Найбільшу біосумісність демонструють гідрогелі на основі альгінату та хітозану, а також децелюляризовані рослинні матрикси (наприклад, листя шпинату), які забезпечують ефективну адгезію клітин.

Технології тривимірного біопрінтингу та тканинної інженерії дозволяють створювати структуровані м'ясні продукти з використанням харчових скафолдів на основі рослинних білків та полісахаридів, які імітують позаклітинну матрику природної м'язової тканини. Застосування біореакторів промислового масштабу забезпечує культивування клітин у режимі суспензійних культур, що критично важливо для масштабування.

Економічний аналіз демонструє позитивну динаміку: якщо у 2013 році вартість першого культивованого бургера становила близько 300000 доларів США, то у 2024-2025 роках окремі компанії досягли собівартості 6.20-10.00 доларів США за фунт продукції при промисловому виробництві. До технологічних викликів належать оптимізація складу культуральних середовищ, зниження вартості факторів росту, забезпечення стабільності органолептичних властивостей продукції та створення ефективних систем контролю якості.

Висновки. Біотехнологічні підходи до створення культивованого м'яса демонструють значний прогрес у напрямку комерціалізації. Ключовими досягненнями є розробка безсироваткових культуральних середовищ, створення стабільних клітинних ліній, впровадження біореакторів промислового масштабу та зниження собівартості виробництва більш ніж у тисячу разів порівняно з початковими етапами розробки. Подальший розвиток технологій культивування, регуляторне схвалення у різних країнах та формування споживачого прийняття є критичними факторами для масового впровадження культивованого м'яса як сталої альтернативи традиційному виробництву.

БІОКАТАЛІТИЧНИЙ СИНТЕЗ УРСОДЕЗОКСИХОЛЕВОЇ КИСЛОТИ: СУЧАСНІ СТРАТЕГІЇ ТА ПРОМИСЛОВІ ПЕРСПЕКТИВИ

Каплюк В.В.

Науковий керівник: Хохленкова Н.В.

Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна

Votsek.88@gmail.com

Вступ. Урсодезоксихолева кислота (УДХК) є вторинною жовчною кислотою, що має виняткове клінічне значення як препарат вибору для лікування холестатичних захворювань печінки та розчинення холестеринових жовчних каменів. Вона краще переноситься та є ефективнішою за хенодезоксихолеву кислоту (CDCA) і застосовується в дозах 8–10

мг/кг/добу. Традиційний хімічний синтез УДХК з жовчевої кислоти (CA) є багатостадійним, має низький вихід ($\leq 30\%$) і потребує використання небезпечних реагентів. Тому актуальними є біокаталітичні та хемо-ензиматичні підходи, які забезпечують високу селективність і м'які умови реакції.

Мета дослідження. Метою роботи є узагальнення сучасних біокаталітичних стратегій отримання урсодезоксихолевої кислоти та оцінити їх промислову перспективність.

Матеріали та методи. Проведено аналіз наукової літератури та патентних джерел за темою ензиматичної епімеризації та селективного гідроксилювання жовчних кислот із застосуванням гідроксистероїддегідрогеназ (HSDHs) та цільноклітинних мікробних систем.

Результати дослідження. Ключовим етапом синтезу УДХК є стереоселективна епімеризація 7 α -гідроксильної групи в 7 β -конфігурацію. Найефективнішими біокаталізаторами для цього виступають NAD(P)H-залежні гідроксистероїддегідрогенази мікробного походження (7 α -HSDH, 7 β -HSDH, 3 α -HSDH, 12 α -HSDH), які отримують із бактерій родів *Clostridium*, *Collinsella*, *Bacteroides*, *Eggerthella* тощо.

Серед промислово орієнтованих підходів найбільш розробленим є біотрансформація хенодезоксихолевої кислоти за допомогою комбінації ферментів 7 α -HSDH та 7 β -HSDH. Використання змішаних культур *Collinsella aerofaciens* і *Bacteroides fragilis* або очищених ферментних препаратів забезпечує конверсію понад 95 відсотків у безкоферментних системах з регенерацією NAD(P)H. Розробка NADH-залежних 7 β -HSDH, зокрема з *Roseococcus sp.* та *Lactobacillus spicheri*, є особливо перспективною, оскільки NADH приблизно у 10 разів дешевший за NADPH.

Альтернативний маршрут через дегідрохолеву кислоту передбачає послідовне відновлення 3-кето та 7-кето груп ферментами 3 α -HSDH з *Pseudomonas testosteroni* і 7 β -HSDH з *Collinsella aerofaciens* з подальшим хімічним видаленням 12-кето групи методом Вольфа-Кішнера.

Рекомбінантні штами *Escherichia coli* з нокаутом гена 7 α -HSDH, що коекспресують ці ферменти разом із системами регенерації коферментів, такими як глюкозодегідрогеназа або форматдегідрогеназа, досягають продуктивності 216 грамів на літр за добу при повному перетворенні 100 мілімолів DHCA за 4.5 години.

Перспективним є також пряме 7 β -гідроксилювання літохалевої кислоти грибами *Fusarium equiseti* та *Gibberella zeae* зі ступенем конверсії до 90 відсотків. У 2024 році ідентифіковано грибовий P450 фермент з *Fusarium equiseti* HG18 з високою 7 β -гідроксилазною активністю, що відкриває можливості для створення повністю біологічних процесів із використанням рослинних стеролів як вихідної сировини.

Основними технологічними викликами залишаються токсичність жовчних кислот для клітин-продуцентів при концентраціях понад 50 мілімолів, нестабільність ферментів у промислових умовах та складність масштабування. Для подолання цих обмежень застосовують інструменти геномного редагування, такі як CRISPR-Cas9, для підвищення толерантності мікроорганізмів та оптимізації метаболічних потоків. Використання консорціумів мікроорганізмів, наприклад *Clostridium* та *Collinsella*, дозволяє розподілити метаболічне навантаження та знизити токсичний ефект.

Висновки. Сучасний біокаталітичний синтез УДХК еволюціонував від використання диких змішаних культур до високопродуктивних рекомбінантних цільноклітинних систем і багатоферментних каскадів. Такі підходи забезпечують високу regio- та стереоселективність, значно вищі виходи та екологічність порівняно з традиційними хімічними методами, що робить їх економічно вигідною альтернативою для промислового виробництва.