

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

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему: **«АНАЛІЗ СУЧАСНИХ БІОТЕХНОЛОГІЙ У ВИРОБНИЦТВІ
СЕРРАТІОПЕПТИДАЗИ»**

Виконав: здобувач вищої освіти 2 курсу групи ПБтм24(1,6д)-01
спеціальності: 162 Біотехнології та біоінженерія
освітньої програми Промислова біотехнологія
Віталій СТЕПАНЕНКО

Керівник: доцент закладу вищої освіти
кафедри біотехнології, к. фарм. н., доц.
Ольга КАЛЮЖНАЯ

Рецензент:
Начальник сектору технологічних досліджень відділу
фармацевтичної розробки ТОВ “БІОЛІК ФАРМА”, к. фарм. н.,
с.н.с. Лариса СІДЕНКО

АНОТАЦІЯ

Проведено комплексний аналіз сучасного ринку ензимних препаратів; встановлено, що в Україні серратіопептидаза представлена переважно імпортними лікарськими засобами та дієтичними добавками (30% та 70% ринку відповідно). Охарактеризовано терапевтичні властивості ферменту (протизапальні, фібринолітичні, антибіоплівкові) та механізми його дії. Обґрунтовано вибір штаму-продуцента *Serratia marcescens* VS56, який відрізняється високою врожайністю, термостабільністю та низькою патогенністю. На основі аналізу наукових робіт досліджено умови культивування та методи очищення ферменту; розроблено технологічну схему виробництва субстанції серратіопептидази, яка базується на мікробному синтезі та багатоетапному очищенні, що забезпечує отримання продукту фармацевтичної чистоти з високою питомою активністю. Загальний обсяг роботи – 61 стор., кількість рисунків 8, таблиць – 10, джерел літератури 85, додатків 1.

Ключові слова: серратіопептидаза, *Serratia marcescens*, біотехнологія, ферментація, очищення білків, фармацевтичний ринок.

ABSTRACT

A comprehensive analysis of the modern enzyme preparations market has been conducted; it was established that in Ukraine, serratiopeptidase is primarily represented by imported medicinal products and dietary supplements (30% and 70% of the market, respectively). The therapeutic properties of the enzyme (anti-inflammatory, fibrinolytic, anti-biofilm) and its mechanisms of action have been characterized. The choice of the producer strain *Serratia marcescens* VS56, which is characterized by high yield, thermal stability, and low pathogenicity, has been justified. Based on the analysis of scientific papers, the cultivation conditions and

enzyme purification methods were investigated; a technological scheme for the production of serratiopeptidase substance was developed, based on microbial synthesis and multi-stage purification, ensuring the production of a pharmaceutical-grade product with high specific activity. The total volume of the work is 61 pages, including 8 figures, 10 tables, 85 literary sources, and 1 appendix..

Key words: serratiopeptidase, *Serratia marcescens*, biotechnology, fermentation, protein purification, pharmaceutical market..

ЗМІСТ

Вступ	5
Розділ 1 Огляд літератури	8
1.1 Перспективність ензимотерапії	8
1.2 Будова серратіопептидази	9
1.3 Властивості серратіопептидази	10
1.4 Сучасні стратегії доставки та біофармацевтичні аспекти серратіопептидази	17
1.5 Аналіз українського ринку препаратів серратіопептидази	19
Висновок до розділу 1	23
Розділ 2 Об'єкти та методи досліджень	25
2.1. Характеристика методів дослідження	25
2.2. Характеристика продуцентів серратіопептидази	30
Висновок до розділу 2	42
Розділ 3 Експериментальна частина	43
3.1 Оптимізація складів живильних середовищ для культивування продуцентів	43
3.2 Вплив фізико-хімічних параметрів на біосинтез ферменту	46
3.3 Вибір методів виділення та очищення ферменту	48
3.4 Пропозиція технології виробництва серратіопептидази для вітчизняного підприємства	49
Висновок до 3 розділу	59
Висновки	60
Список використаних джерел	62
Додаток. Публікації за темою роботи	72

ВСТУП

Актуальність теми. Серратіопептидаза є металопротеазою з молекулярною масою 45–60 кДа, яка виробляється бактеріями роду *Serratia* та має потужні протизапальні, фібринолітичні, муколітичні та антибіоплівкові властивості [1]. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), хронічні запальні захворювання, такі як артрит, бронхіт та синусит, є глобальною проблемою, що впливає на мільйони людей, особливо в умовах старіння населення та постпандемічних ускладнень COVID-19 [2]. Фермент пригнічує вивільнення брадикініну, серотоніну та гістаміну, зменшує набряки та біль, а також розріджує слиз і руйнує біоплівки, посилюючи дію антибіотиків [1]. Глобальний ринок серратіопептидази оцінювався у 300 млн дол. США у 2023 році і прогнозується зростання до 540 млн дол. до 2032 року з середньорічним темпом зростання (CAGR) 6,5%, зумовленим зростанням хронічних хвороб, попитом на натуральні альтернативи НПЗЗ та дослідженнями нових застосувань, таких як лікування Альцгеймера та раку [3].

В Україні серратіопептидаза використовується в системній ензимотерапії для лікування хронічних запальних захворювань, зокрема в урології (хронічний простатит), хірургії, ортопедії та гінекології. Препарати, сприяють зменшенню набряків, болю та покращенню відновлення, посилюючи антибіотичну терапію проти біоплівок. Однак вітчизняне виробництво обмежується отриманням лікарських форм з імпортованої субстанції зарубіжного виробництва, що призводить до залежності від постачальників та зростання витрат. Адаптація сучасних біотехнологій на основі природних непатогенних штамів *Serratia spp.* або рекомбінантне виробництво в *E. coli* може дозволити локальне виробництво субстанції, зменшити імпорт та підвищити доступність препаратів. Таким чином, аналіз сучасних технологій виробництва серратіопептидази з перспективою їх

впровадження на українських підприємствах є актуальним для забезпечення фармацевтичної незалежності та відповіді на зростаючий попит.

Метою дослідження полягає в аналізі сучасних біотехнологій виробництва серратіопептидази у світі та розробці перспективи її адаптації на українських підприємствах.

Завдання дослідження:

1. Провести аналіз джерел літератури щодо стану сучасного ринку виробництва серратіопептидази;
2. Охарактеризувати типи препаратів серратіопептидази, що випускаються сучасними виробниками;
3. Розглянути штами мікроорганізмів для виробництва серратіопептидази, провести вибір об'єктів дослідження, проаналізувати їхні переваги та недоліки та запропонувати найоптимальніший;
4. Дослідити технології виробництва серратіопептидази, запропонувати серед них найоптимальнішу та найдоступнішу;
5. Згідно з проведеним аналізом, розробити технологічну схему виробництва серратіопептидази для реалізації на вітчизняному підприємстві.

Об'єкти дослідження: штами мікроорганізмів для виробництва серратіопептидази: *Serratia marcescens* VS56 (ізолят з ґрунту), *Serratia marcescens* C8 (ізолят з кишечника шовкопряда), *Serratia marcescens* MES-4 (ендофіт з *Morus rubra*), рекомбінантні штами *Escherichia coli* BL21 (DE3) з вектором pET SUMO, а також інші штами, такі як *Chryseomicrobium amylolyticum* VS10 та *Kocuria rosea* VS18.

Предметом дослідження є сучасні біотехнології отримання серратіопептидази на основі різних штамів мікроорганізм.

Методи дослідження. Методи опрацювання інформації з наукових публікацій та інших інформаційних джерел включали цілеспрямований пошук і скринінг літературних даних, критичний аналіз і відбір релевантних джерел, порівняльний аналіз отриманих відомостей, їх узагальнення та систематизацію. Під час теоретичного аналізу застосовувалися методи аналізу

та синтезу, індукції й дедукції, абстрагування, логічного узагальнення та класифікації, а також інтерпретація й концептуалізація наукових результатів, представлених у дослідженнях.

Практичне значення отриманих результатів. Проведений аналіз сучасних технологій виробництва серратіопептидази та розроблена на його основі технологічна схема можуть бути використані на вітчизняних підприємствах для виробництва субстанції, зменшення залежності від імпорту та підвищення доступності препаратів.

Апробація результатів дослідження і публікації. Окремі результати досліджень представлені на VI Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю, 10-11 грудня 2025 р., м. Харків, та опубліковані у матеріалах:

Степаненко В.Д. Аналіз сучасних біотехнологічних методів виробництва серратіопептидази / Степаненко В. Д., наук. керівн. Калюжная О.С. // VI Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю «YOUTH PHARMACY SCIENCE», 10-11 грудня 2025 р., НФаУ. – Харків, 2025. – С. 219-221.

Структура та обсяг кваліфікаційної роботи.

Робота складається зі вступу, трьох розділів - огляду літератури, об'єктів та методів дослідження, експериментальної частини, висновку. Загальний обсяг роботи 61 стор., кількість рисунків 8, таблиць – 10, джерел літератури 85, додатків 1.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Перспективність ензимотерапії

Ідея використання ферментів як замісної терапії при патологіях була вперше висунута де Дювом ще у 1964 році [4]. Сьогодні, на тлі появи нових хвороб та обмеженості традиційних методів, ензимотерапія стала достатньо важливою. Ключовими перевагами ферментів перед небілковими препаратами є їхня висока селективність та здатність до швидкого багаторазового перетворення субстратів [5].

Сьогодні ферменти інтегровані в терапію широкого спектра патологій: онкологія – каспази та L-аспарагіназа або L,L-глутаміназа (ефективні при гострому лімфобластному лейкозі), серцево-судинні та судинні розлади – серинові протеази, стрептокіназа, інші напрямки – розлади травлення, очищення ран, лізосомальні хвороби накопичення, запальні процеси, порушення згортання крові та генетичні аномалії. У науковій літературі підкреслюється терапевтичний потенціал таких ензимів, як колагеназа, протеази, лізостаїн, лакказа, глутаміназа та ліпаза [5, 6].

Попри високу ефективність, широке впровадження ензимотерапії стримується низкою факторів: великим розміром молекул, що ускладнює їхнє транспортування та рівномірний розподіл в організмі; імуногенністю, що проявляється у ризику виникнення небажаних імунних відповідей; нестабільністю через короткий період напіввиведення та наявність домішок.

Через ці труднощі Управління з продовольства і медикаментів США (FDA) схвалило лише обмежену кількість препаратів. Серед них – засоби для лікування кардіоваскулярних хвороб, зокрема альтеплаза, ретеплаза, тенектеплаза, урокіназа, стрептокіназа та аністреплаза [7]. Також існують ферменти з унікальними властивостями: супероксиддисмутаза, аденозиндеаміназа, фенілаланін амоній ліаза, дорназа, расбуриказа та серратіопептидаза [7].

1.2 Будова серратіопептидази

Серратіопептидаза (серрапептаза) є екстрацелюлярною цинк-вмісною металопротеазою (ЕС 3.4.24.40) з молекулярною масою 45–60 кДа [1]. Фермент містить три атоми цинку як ліганди та один активний сайт. Наявність атома цинку є необхідною і також посилює протеолітичну активність серрапептази. Структура серрапептази з трьома лігандами цинку була передбачена та підтверджена шляхом порівняння структури серрапептази з термолізином та нейтральною протеазою *Bacillus subtilis* [9].

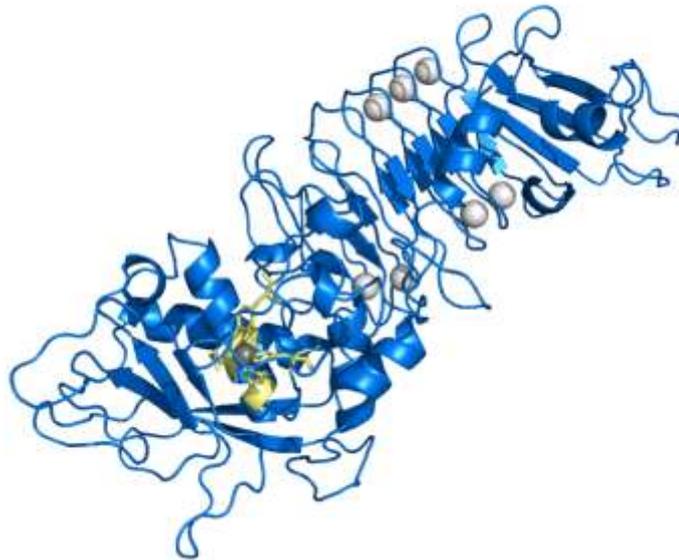


Рис. 1.1 – Тривимірна будова молекули серратіопептидази (Ілюстрація взята з [8])

Серратіопептидаза складається з 470 амінокислот (молекулярна формула $C_{46}H_{40}N_8O_8$) і не містить сірковмісних амінокислот, таких як цистеїн та метіонін. Вміст G+C у кодуючій ділянці для зрілого білка становить 58%.

Фермент демонструє максимальну активність при рН 9 та до 40 °С, інактивується при 55 °С протягом 15 хв, має ізоелектричну точку 5,3.

Фермент зв'язується з α -2-макроглобуліном у біологічних рідинах, у крові зв'язується в співвідношенні 1:1. Він має сильну афінність до

циклооксигенази (COX) I та II, пригнічуючи вивільнення інтерлейкінів, простагландинів та тромбоксану, без впливу на ліпооксигеназний шлях [9].

1.3 Властивості серратіопептидази

Застосування серратіопептидази у препаратах обумовлено її протизапальною, ранозагоювальною, антибіоплівковою, фібринолітичною діями (табл. 1.1).

Таблиця 1.1 – Механізми дії серратіопептидази

Фармакологічна дія	Механізм дії
Протизапальна	Регулює запальні цитокіни і, таким чином, запобігає розвитку хронічного запалення. Модифікує молекули клітинної адгезії, які спрямовують імунні клітини до вогнищ запалення. Сприяє загоєнню ран, відновленню тканин та нормалізації температури шкіри в місці запалення. Має вищу ефективність при використанні в комбінації з іонами металів, такими як цинк і марганець
Ранозагоювальна	Сприяє розрідженню рідин у запалених зонах, полегшуючи їхній дренаж. Це призводить до зменшення набряку, болю та прискорює відновлення тканин. Активує процес загоєння завдяки своїй унікальній властивості розчиняти мертві тканини навколо ураженої ділянки, не пошкоджуючи при цьому живі тканини. Гідролізує брадикінін, гістамін і серотонін, що допомагає знизити больові відчуття і набряклість, а також покращити мікроциркуляцію, що підтримує процес регенерації ран
Антибіоплівкова	Модулює експресію молекул адгезії та зменшує кількість поверхневих білків бактерій. Запобігає формуванню біоплівок, а також допомагає руйнувати вже сформовані структури. Її антибіоплівкова активність сприяє кращому проникненню антибіотиків крізь стійку біоплівку, підвищуючи таким чином чутливість бактерій до антибактеріальних препаратів.
Фібринолітична	Розчиняє тромби та атеросклеротичні бляшки шляхом розщеплення фібрину, а також інших мертвих або пошкоджених тканин. Також здатна видалити відкладення жирових речовин, холестерину та клітинних відходів всередині артерій.

Протизапальні властивості. Запалення є фундаментальним захисним механізмом у відповідь на травматичні ушкодження або інфекційні агенти. Шляхом залучення імунних клітин та специфічних медіаторів до вогнища ураження, імунна система забезпечує «очищення» тканин та відновлення гомеостазу. Залежно від природи подразника та стану тканин, запальний

процес може бути гострим або хронічним. У випадках, коли гостра фаза не завершується успішно, вона переходить у хронічну форму, що лежить в основі таких захворювань, як артрит, синусит, бронхіт, синдром карпального тунелю та фіброзно-кістозна мастопатія [2, 9].

Традиційні підходи до лікування передбачають використання нестероїдних протизапальних засобів (НПЗП), іноді в комбінації з кортикостероїдами [10]. Проте значна кількість побічних ефектів цих препаратів зумовила пошук альтернатив, зокрема серед ферментів. Особливу увагу привертають серинові протеази, які мають здатність зв'язуватися з циклооксигеназами (ЦОГ-I, ЦОГ-II, англ. COX-I та COX-II), що відносяться до ферментів синтезу медіаторів запалення. Зокрема, фермент ЦОГ-I забезпечує метаболізм арахідонової кислоти, що призводить до синтезу простагландинів та інтерлейкінів [9, 10]. Серинові протеази, завдяки високій спорідненості до цих молекул, здатні виконувати роль протизапальних чинників. Вони впливають безпосередньо на вогнище запалення, регулюючи рівень запальних цитокінів та модифікуючи молекули клітинної адгезії [11].

За відсутності регуляторного впливу цих ферментів у місці травми виникає больовий синдром і набряк, що запускає вивільнення простагландинів та подальші каскадні реакції (Рис. 1а). Серратіопептидаза має здатність зв'язуватися з циклооксигеназою, тим самим блокуючи секрецію інтерлейкінів та простагландинів (Рис. 1б). При пероральному прийомі таблетованих форм серратіопептидази спостерігається зниження інтенсивності болю та запального процесу [1].

Механізм дії цього ензиму зосереджений на циклооксигеназному шляху метаболізму арахідонової кислоти (ЦОГ-I та ЦОГ-II) і не поширюється на ліпооксигеназний шлях (ЛОГ, англ. LOX). Варто зазначити, що шлях ЛОГ залучений у регуляцію запалення через каталіз біосинтезу спеціалізованих про-вирішуючих медіаторів, а також пов'язаний із механізмами неспецифічного інгібування НПЗП [11].

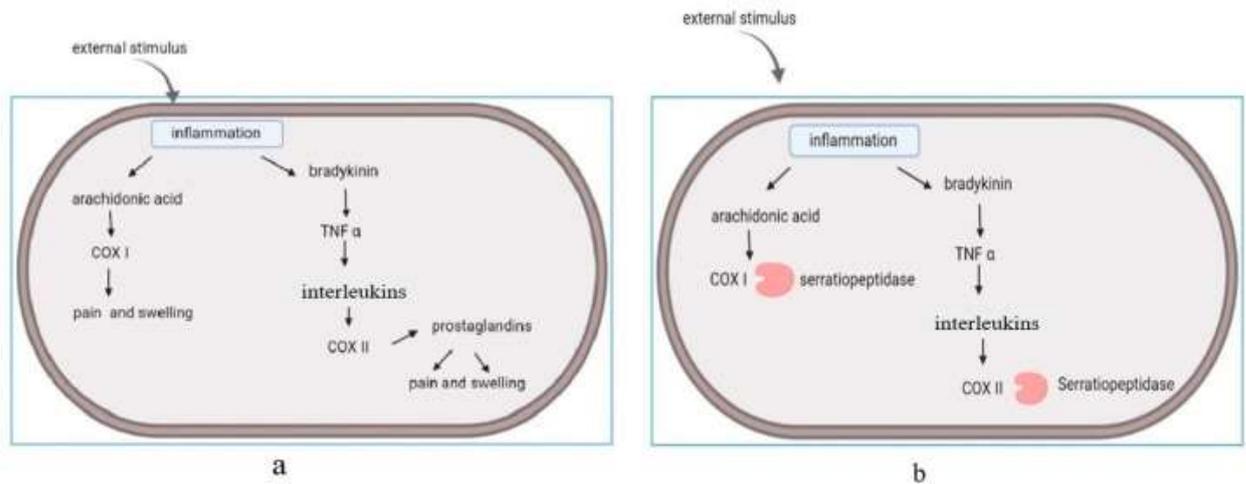


Рис. 1.2 - Шлях арахідонової кислоти: (а) вивільнення інтерлейкінів та простагландинів викликає біль та набряк. (б) Механізм дії: сerratіопептидаза діє на фермент циклооксигеназу (ЦОГ I та ЦОГ II) та пригнічує вивільнення інтерлейкінів та простагландинів (Ілюстрація взята з [1])

Сerratіопептидаза почала застосовуватися як протизапальний засіб у Японії ще з 1957 року [1]. Вона демонструє високу ефективність як при самостійному застосуванні, так і в комбінації з НПЗП [11].

Ефективність сerratіопептидази як протизапального агента була підтверджена низкою експериментальних досліджень, наприклад:

1. Порівняння з аналогами - встановлено, що на моделі карагінан-індукованого набряку у щурів сerratіопептидаза перевершує за дією аспірин, трипсин та хімотрипсин. Було зафіксовано посилення терапевтичного ефекту при одночасному прийомі з аспірином [12].

2. Порівняння з диклофенаком - виявлено, що сerratіопептидаза (10–20 мг/кг) не поступається диклофенаку натрію (0,5 мг/кг) у купіруванні гострого та хронічного запалення. Вища доза ферменту пояснюється його обмеженою біодоступністю, що наразі вирішується розробкою нових систем доставки [13].

3. Лікування виразкового коліту - на моделі оцтовокислотного коліту у мишей дослідження показало, що сerratіопептидаза суттєво покращує стан слизової оболонки. Фермент сприяв зниженню індексу активності хвороби, запобігав патологічному скороченню кишки та збільшенню селезінки. Крім

того, спостерігалася нормалізація біохімічних маркерів: зниження рівнів С-реактивного білка, мієлопероксидази, оксиду азоту та продуктів перекисного окиснення ліпідів при збереженні запасів глутатіону [14].

Також великий обсяг клінічних даних [15-17] підтверджує здатність серратіопептидази ефективно зменшувати больовий синдром та набряклість при різних патологіях.

Антибіоплівкова дія. Бактеріальні біоплівки являють собою складні багатокомпонентні агрегати мікроорганізмів, занурених у захисний позаклітинний матрикс із полімерів та білків. Вони здатні формуватися як на живих тканинах, так і на абіотичних об'єктах. Головною загрозою біоплівок є їхня надзвичайна стійкість до імунної відповіді організму та толерантність до антибіотиків (у 100 разів вища, ніж у вільних бактерій), що призводить до рецидивуючих інфекцій сечовивідних шляхів, легень, серця (ендокардит) та кісток (остеомієліт) [18]. Особливу проблему вони становлять для пацієнтів з імплантатами, катетерами та протезами.

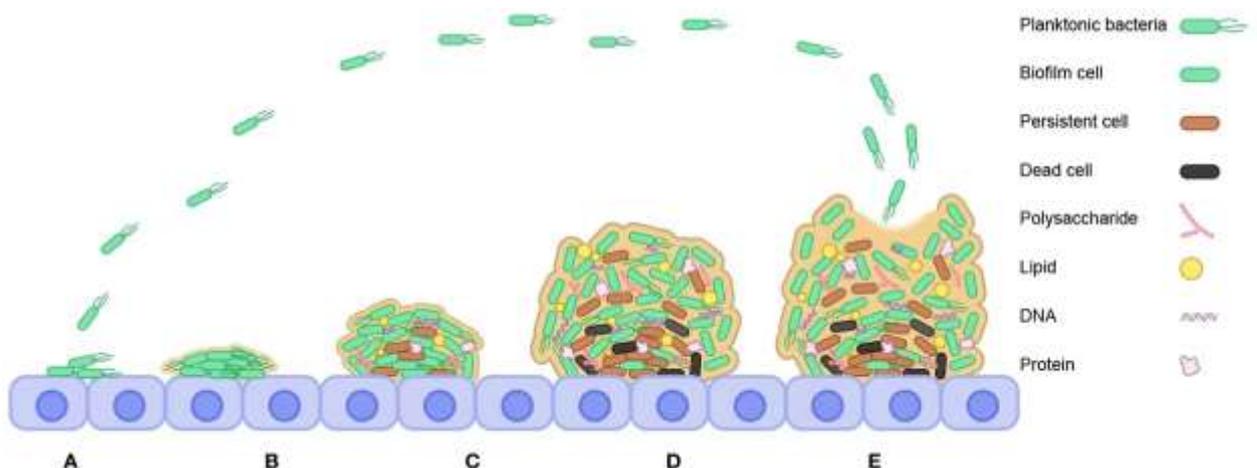


Рис. 1.3 - Етапи формування бактеріальної біоплівки: (А) Оборотноє прикріплення. (В) Необоротне прикріплення. (С) Бактеріальні клітини синтезують та секретують ендopolісахариди. (D) Дозрівання. (Е) Розсіювання. (Ілюстрація взята з [18])

Для подолання цієї резистентності розробляються стратегії інгібування та розщеплення матриксу. Оскільки білки відіграють ключову роль у структурі біоплівок, науковці висунули гіпотезу про ефективність протеаз, зокрема

металопротеаз, у боротьбі з ними. Серратіопептидаза, будучи доступною бактеріальною металопротеазою, продемонструвала високу результативність завдяки модифікації вірулентності бактерій, здатності руйнувати вже сформовані (зрілі) біоплівки, посиленню бактерицидної дії антибіотиків.

Досліди в лабораторних умовах підтверджують, що серратіопептидаза впливає на білки, відповідальні за адгезію та інвазію патогенів (наприклад, *Listeria monocytogenes*) [19, 20]. Дослідження [21] показало, що серратіопептидаза ефективніше за інші протеази інгібує штами *Staphylococcus aureus* та *S. epidermidis*, зменшуючи здатність до інвазії у 200 разів без шкоди для клітин людини.

Важливо, що антибіоплівкова дія серратіопептидази не залежить від її здатності розщеплювати білки (протеолізу). Мутантні форми ферменту без протеолітичної активності все одно перешкоджали формуванню плівок на медичних виробках [22]. Також було встановлено безпеку ферменту для остеобластів (клітин кістки), що відкриває перспективи лікування інфекцій кісткової тканини [23]. У поєднанні з антибіотиками серратіопептидаза діє як «біологічний нанодриль», полегшуючи проникнення ліків крізь бар'єр біоплівки [24].

Експерименти на щурах продемонстрували, що комбінація серратіопептидази з антибіотиком знижує частоту перипротезних інфекцій [25]. У клінічній практиці особливе значення має лікування периімплантиту. Через приховані симптоми та стійкість бактерій до лікування, запалення навколо імплантатів часто призводить до руйнування кістки. Дослідження [26, 27] на великих групах пацієнтів підтвердили, що додавання серратіопептидази до антибіотикотерапії: підвищує концентрацію ліків у тканинах, прискорює загоєння та відновлення кісткових уражень, суттєво покращує мікробіологічні та клінічні показники. Це робить сумісне введення ферменту та антибіотиків перспективним методом лікування інфекцій, що підтверджено численними дослідженнями [24, 28].

Ранозагоювальна активність. Серратіопептидаза відіграє важливу роль у процесах регенерації тканин. Механізм її впливу базується на розчиненні некротичних мас навколо рани та гідролізі ключових медіаторів – серотоніну, гістаміну й брадикініну. Така активність сприяє нормалізації мікроциркуляції в зоні ураження, що безпосередньо стимулює загоєння [29]. Здатність гідролізувати медіатори болю відповідає і за механізм знеболення ферменту.

Стандартний біологічний процес відновлення тканин включає чотири послідовні стадії: гемостаз, запалення, проліферацію та дозрівання (рис. 1.4).

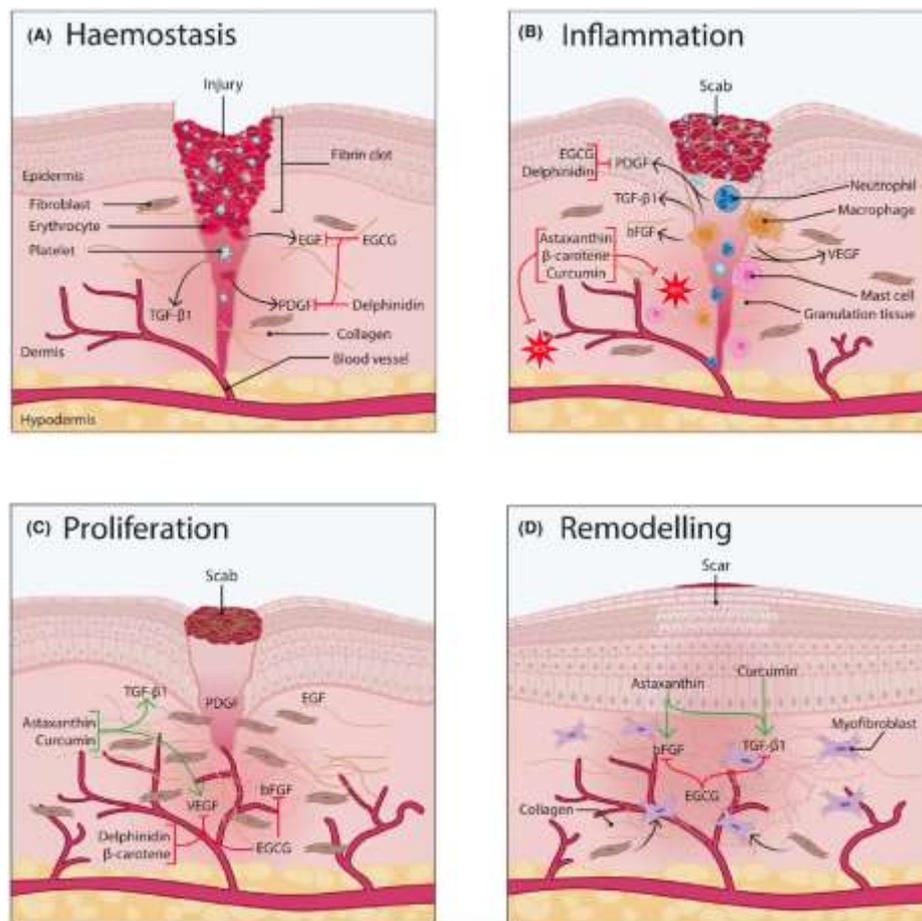


Рис. 1.4 – Біологічний процес відновлення тканин (А) Фаза гемостазу: тромбоцити виробляють фактори росту, які діють як хемоатрактанти для запальних імунних клітин. (В) Фаза запалення: запальні імунні клітини, такі як нейтрофіли, тучні клітини та макрофаги, секретують цитокіни, активні форми кисню (АФК) та фактори росту. Мікроваскуляризація збільшується, моноцити дозрівають у макрофаги, які вивільняють хемоатрактанти для кератиноцитів та фібробластів. (С) Фаза проліферації: посилення

ангіогенезу, міграції та проліферації кератиноцитів, міграції та диференціації фібробластів, а також синтезу колагену. (D) Фаза ремоделювання: дозрівання рубця та ремоделювання позаклітинного матриксу. (Ілюстрація взята з [30])

Серратіопептидаза здатна позитивно впливати на мікросудинне русло та підтримувати фазу гемостазу. Фермент мінімізує капілярну проникність, зумовлену дією медіаторів запалення, розщеплює патологічні ексудати та білкові структури, а також прискорює виведення продуктів розпаду через лімфатичну та кровоносну системи. Ще одним важливим аспектом є здатність ферменту зменшувати ексудацію у вогнищі запалення, що полегшує мікроциркуляцію та прискорює репаративні процеси [11].

Серратіопептидаза демонструє широкий спектр терапевтичних ефектів, що виходять за межі основних дій, окреслених вище, зокрема аналгетичну, муколітичну, гемолітичну активності [11].

Завдяки переліченим вище механізмам дії серратіопептидаза має потенціал для лікування та профілактики таких захворювань, як атеросклероз, артрит, бронхіт, синдром зап'ястного каналу, фіброзно-кістозна хвороба молочної залози, хвороба Крона, виразки ніг, травматичний набряк, фіброміалгія, набряк грудей, мігрень, хвороба Альцгеймера, синусит, гепатит, захворювання легень, артрит, діабет, закупорка сонної артерії, тромбоз, фіброміома матки. Серратіопептидазу також можна використовувати як засіб для лікування жінок, які страждають на ендометріоз, фермент також відводить скупчення рідини при мастектомії та розчиняє утворення в грудях. Також використовують для загоєння розтягнення м'язів, виразки ніг, травматичних пошкодженнях, розривах зв'язок, післяопераційних запалень. Фермент діє як агент, що дисоціює амілоїд, з потенціалом для розщеплення інсулінових амілоїдів, і тому може розглядатися як потенційний препарат для лікування різних захворювань, пов'язаних з амілоїдом. Загалом, дослідження щодо застосування цього ферменту в лікуванні інших хронічних захворювань все ще тривають [11].

1.4 Сучасні стратегії доставки та біофармацевтичні аспекти серратіопептидази

Основними перешкодами при розробці систем доставки різноманітних лікарських засобів є обмежена розчинність, системна токсичність, хімічна нестабільність, фармацевтична несумісність та низька мембранна проникність. Вибір оптимальної платформи для доставки залежить від специфічних фізико-хімічних властивостей активної субстанції.

До проблем пероральної доставки серратіопептидази відносяться протеолетична деградація та низька біодоступність. Через білкову природу фермент піддається інтенсивному руйнуванню під дією пепсину та соляної кислоти в шлунково-кишковому тракті. Гідрофільність молекули серратіопептидази зумовлює її слабку проникність крізь ліпідний бішар кишкових мембран. Ці фактори зумовлюють необхідність застосування надлишкових доз для досягнення терапевтичного ефекту.

Для оптимізації фармакокінетичного профілю, забезпечення пролонгованого вивільнення та підвищення комплаєнсу пацієнтів досліджуються інноваційні системи доставки: магнітні наночастинки, мікросфери, ліпосомальна інкапсуляція та емульсійні системи.

Як для багатьох активних інгредієнтів важливу роль у ефективності серратіопептидази має спосіб доставки, тому, окрім традиційного перорального застосування на різних етапах розробки знаходяться препарати у формі гелів, пластирів, інкапсуляція у наночастинки та ліпосоми (табл. 1.2) [24, 31-38]. Прикладом вдосконалення систем доставки фермента є розробка біосумісної гідрогелевої системи на основі полівінілового спирту та желатину, в яку були інкорпоровані мікросфери з полі(D,L-молочно-коглікової кислоти) (PLGA), навантажені серратіопептидазою та гентаміцином [39]. Результати досліджень підтвердили контрольоване вивільнення компонентів безпосередньо у вогнищі ураження, що суттєво прискорює регенерацію тканин. Також було розроблено місцеві форми (гелі та

мазі), що дозволяють уникнути побічних ефектів перорального прийому, таких як анорексія, нудота та диспепсичні розлади [40]. В експериментах на моделях щурів оптимізовані гелі продемонстрували ефективне пригнічення набряку та високий профіль безпеки (відсутність алергічних реакцій). У інших дослідження використовувати полімери серії Eudragit для створення кишковорозчинних дисперсій серратіопептидази, що дозволяє захистити фермент від шлункового соку та забезпечити його вивільнення в тонкому кишечнику [41].

Таблиця 1.2 – Дослідження різних форм доставки серратіопептидази

Спосіб доставки/ Носій	Результати дослідження
Інкапсуляція у наночастинки альбуміну	Ефективність захоплення 85 % та вивільнення препарату 79.3 %
Інкапсуляція у ліпосоми	Серратіопептидаза, інкапсульована в ліпосоми разом з антибіотиком левофлораксацином, має антибіоплівкову активність по відношенню до <i>S. aureus</i>
Емульгований щічний пластир серратіопептидази з гвоздичною олією	Значна ефективність захоплення була отримана разом з контрольованим вивільненням протягом 24 год
Полі(D,L-молочно-ко-гліколева кислота) мікросфери серратіопептидази та гентаміцину, захоплені в полівініловий спирт-желатиновий гідрогель	Система доставки ефективна в сприянні природному очищенню, гідратуючи некротичну тканину, забезпечує пряме стійке вивільнення антибіотиків та серратіопептидази для кращого та швидшого загоєння ран
Інкапсуляція у наночастинки хітозану	Стійке вивільнення до 24 год, тривалий протизапальний ефект до 32 год
Мікросфера серратіопептидази в полімері Eudragit RS100	Тривале вивільнення серратіопептидази для стійкого терапевтичного ефекту
Ліпосомальні форми серратіопептидази	Ефективність захоплення 86 %, покращення проникності
Трансдермальний пластир серратіопептидази за допомогою ліпідних трансферсом	Ефективність захоплення 96,76 %, вивільнення <i>in vitro</i> та <i>in vivo</i> було контрольованим та стабільним
Нізомальний гель серратіопептидази	Ефективність захоплення 54,82 % з пролонгованим вивільнення, протизапальна активність була порівнянною з гелем диклофенаку
Серратіопептидаза та метронідазол, завантажені у мікросфери альгінату за допомогою емульсифікації	Висока ефективність завантаження, покращене загоєння ран
Серратіопептидаза, іммобілізована на аміно-функціоналізованих магнітних наночастинках	Іммобілізація збільшила проникнення через мембрану та зменшила дозу серратіопептидази для протизапального ефекту

1.5 Аналіз українського ринку препаратів серратіопептидази

Аналіз українського ринку препаратів серратіопептидази базується на даних з аптечних сайтів (tabletki.ua, apteka911.ua, anc.ua, podorozhnyk.ua, apteka24.ua), Державного реєстру лікарських засобів (drlz.com.ua), сайту Ліки контроль (likicontrol.com.ua) та інформації про дієтичні добавки від МОЗ України. Реєстр ліків містить обмежену кількість записів, дієтичних добавок, які часто позиціонуються як «джерело ферменту» для підтримки здоров'я, на українському ринку значно більше.

Результати проведеного аналізу (табл. 1.3) свідчать, що на вітчизняному фармацевтичному ринку серратіопептидаза представлена у двох категоріях: зареєстровані лікарські засоби (ЛЗ) та дієтичні добавки (ДД). Співвідношення цих категорій у загальній структурі пропозиції становить 30% та 70% відповідно.

За даними Державного реєстру лікарських засобів (ДРЛЗ) України, ЛЗ серратіопептидази здебільшого є продукцією індійського виробництва. Їхнє клінічне застосування регламентоване для терапії запальних процесів різної локалізації, купірування набрякового синдрому та забезпечення фібринолітичної активності. ДД, як імпортного, так і вітчизняного походження, позиціонуються як додаткові джерела протеолітичних ферментів для загальнооздоровчих цілей; вони не мають статусу ЛЗ і не можуть розглядатися як альтернатива базовій фармакотерапії. Загалом ідентифіковано понад 30 комерційних назв продуктів. Слід підкреслити, що ринок повністю залежний від імпорту діючої речовини. Локальне виробництво обмежене операціями з фасування, пакування або створення багатокомпонентних рецептур ДД.

Таблиця 1.3 – Список лікарських засобів та дієтичних добавок із серратіопептидазою

Назва	Форма та дозування	Виробник (країна)	Склад (діючих речовин)	Показання (за інструкцією для ЛЗ) / рекомендації (за описом ДД)
Лікарські засоби				
Серрата	Таблетки, вкриті оболонкою, 10 мг (№30, №150)	Kusum Healthcare Pvt. Ltd. (Індія)	Серратіопептидаза 10 мг	Зменшення запалення, набряків, болю; фібриноліз; травми, хірургія, ЛОР-захворювання
Мовіназа-10 мг	Таблетки, кишковорозчинні, 10 мг (№30)	Movi Health GmbH (Швейцарія / Індія)	Серратіопептидаза 10 мг	Протизапальна, проти набрякова дія; розрідження слизу
Мовіназа-20 мг	Таблетки, кишковорозчинні, 20 мг (№30)	Movi Health GmbH (Швейцарія / Індія)	Серратіопептидаза 20 мг	Аналогічно Мовіназа-10, для інтенсивніших станів
Фібриназ а-10	Таблетки, кишковорозчинні, 10 мг (№10, №30)	Evertogen Life Sciences Ltd. (Індія)	Серратіопептидаза 10 мг	Фібриноліз, зменшення набряків, запалення
Фібриназ а-20	Таблетки, кишковорозчинні, 20 мг (№30)	Evertogen Life Sciences Ltd. (Індія)	Серратіопептидаза 20 мг	Травми опорно-рухового апарату, запалення
Фламідез	Таблетки, вкриті оболонкою (№10, №30)	Organosyn Life Sciences Ltd. (Індія)	Парацетамол 500 мг + диклофенак калію 50 мг + серратіопептидаза 15 мг	Комбіноване: біль, запалення, набряки (артрит, травми)
Арпептид	Таблетки, кишковорозчинні, капсули, 10 мг (№30)	Biodeal Pharmaceuticals Pvt. Ltd. (Індія)	Серратіопептидаза 10 мг	Запалення, набряки, фібриноліз
Дієтичні добавки				
Рідексія	Капсули (№30)	Nutrimed (Україна)	Серратіопептидаза 10 мг	Підтримка при запаленнях, набряках; відновлення тканин. Добре проникає в місця запалення, лізує некротизовані тканини, зменшує гіперемію та прискорює дію антибіотиків
Сертідаза	Таблетки 10 мг (№150)	Vetprom AD (Болгарія)	Серратіопептидаза 10 мг	Джерело ензимів; профілактика запалень, травми, сприяє зменшенню набряків

Сертідаза Форте	Таблетки (№30)	Vetprom AD (Болгарія)	Серратіопептидаза 20 мг	Підтримка імунітету, витривалості, відновлення, при болях у м'язах, спині; протизапальна дія.
Запаліназа	Таблетки, вкриті оболонкою (№30)	Харківська фармацевтична фабрика (Україна)	Серратіопептидаза 10 мг	Додаткове джерело; зменшення запалення, набряків
Ксантаза	Капсули (№30)	Ozumuk Pharm (Україна)	Серратіопептидаза 10 мг + астаксантин 4 мг	Антиоксидантна підтримка; протизапальна дія при простатиті, покращує стан судин
Асартаза	Капсули (№30)	Astrapharm (Україна)	Серратіопептидаза 10 мг	Для комплексної дії при травмах; зменшує дилатацію капілярів та контролює проникність
Серрапейн	Таблетки (№30)	Fidem Pharm (Україна)	Серратіопептидаза 10 мг	Джерело ферменту; підтримка при болю, набряках
Серратіо	Таблетки 10 мг (№30)	Technobio (Україна)	Серратіопептидаза 10 мг	Збалансований раціон; джерело ензимів, фібринолітична дія
Лібоксаза	Капсули (№30)	Bovios Pharm (Україна)	Серратіопептидаза - 9 мг (18000 ОД) + Наттокіназа (nattokinase) - 50 мг (1000 ФО).	Комбінація для підтримки дихальної та опорно-рухової систем; фібринолітичний ефект.
Полібіозим	Капсули (№30)	Technobio (Україна)	Комплекс ензимів: Бромелаїн - 250 мг; Папаїн - 125 мг; Панкреатин - 100 мг; Серратіопептидаза - 10 мг; Трипсин - 30 мг.	Комплекс ензимів для активізації відновлення; рослинного та тваринного походження
Серензим	Таблетки 10/20 мг (№30)	Eubion (Польща)	Серратіопептидаза 10/20 мг (залежно від форми)	Зменшення ушкоджень тканин, протизапальна та протинабрякова дія.
Тутоназа	Таблетки, кишковорозчинні 10/20 мг (№30)	Eubion (Польща)	Серратіопептидаза 10/20 мг (залежно від форми)	Запобігання спайок, відновлення, природний фермент для розщеплення білків
Ензібар Інфламаза	Таблетки (№30)	Advanced Vital Enzymes (Індія)	Комплекс ферментів - Серратіопептидаза + бромелаїн, рутин	Зменшення запалення, розщеплення спайок
Вітаза	Таблетки 10 мг (№30)	Agripro (Україна)	Серратіопептидаза 10 мг	Джерело протеолітичних ензимів, для підтримки при запаленнях

Оптідаза	Капсули (№30)	Bovios Pharm (Україна)	Метилсульфонілметан - 400 мг; Серратіопептидаза - 10 мг.	Підтримка при травмах, зменшує запалення та біль
Серратол екс	Капсули (№30)	Msk-med (Україна)	Аскорбінова кислота - 50 мг; Рутозид - 50 мг; Екстракт бромелаїну - 45 мг; Серратіопептидаза - 10 мг.	Комплекс для репродуктивної, опорно- рухової систем; антиоксидантна дія
Серралізи н Форте	Капсули (№30)	Grow Pharm (Україна)	Метилсульфонілметан - 400 мг; Серратіопептидаза - 20 мг	Джерело ферменту, має протизапальні властивості.
Серралізи н	Капсули (№30)	Nutrimed (Україна)	Метилсульфонілметан - 400 мг; Серратіопептидаза - 10 мг	Для зменшення в'язкості виділень та полегшення відходження мокротиння
Серталон г	Капсули (№30)	Organic (Україна)	Серратіопептидаза 25 мг	Джерело ензимів
Фортіназа	Таблетки (№30)	Astrapharm (Україна)	Серратіопептидаза 10 мг	Підтримка серцево-судинної системи, фібринолітична дія
Лібоксаза Форте	Капсули (№30)	Bovios Pharm (Україна)	Серратіопептидаза - 18 мг (36000 ОД); Наттокіназа - 100 мг (2000 ФО).	Загальна підтримка дихальної та опорно- рухової систем; посилений фібриноліз.
Запаліназ а Максі	Таблетки, вкриті оболонкою (№30)	Farmmedpak (Україна)	Серратіопептидаза 20 мг	Підвищення захисних сил
Юнона Фармліга	Капсули (№30)	Fitoproduct (Україна)	Екстракт коріння Гірчака японського - 100 мг; Метилсульфонілметан - 100 мг; Серратіопептидаза - 10 мг; Оксид цинку - 10 мг; Екстракт плодів прудняку звичайного - 5 мг; Екстракт листя Даміани - 5 мг	Комплекс для жіночого здоров'я; стандартизовані екстракти для гормонального балансу
Петагма	Таблетки (№30)	Vetprom (Болгарія)	Серратіопептидаза 10 мг	Травми опорно-рухового апарату, сприяє відновленню після операцій
Сіналоніл	Капсули (№30)	Pharma Plus (Україна)	Уридину-5-динатрію монофосфата - 50 мг т; Серратіопептидаза - 10 мг; Вітамін В6 - 1,7 мг; Вітамін В1 - 1,3 мг; Фолієва кислота - 400 мкг; Вітамін В12 - 3 мкг	Додаткове джерело поживних речовин, таких як урідінмонофосфат, фолієва кислота вітаміни В12, В6, В1 та серратіопептидаза. Сприяє активізації власних відновлювальних процесів в пошкоджених нервових клітинах.

Лікарські засоби представлені переважно монопрепаратами у формі таблеток. Основні терапевтичні напрямки включають хірургію, ортопедію та отоларингологію. Стандартний діапазон дозування діючої речовини становить 10–20 мг. Серед виробників домінують закордонні компанії, зокрема індійські.

Дієтичні добавки характеризуються переважанням комбінованих складів (наприклад, поєднання серратіопептидази з астаксантином у Ксантазі, з іншими ферментами – бромелаїном у Ензібар Інфламазі тощо). Призначаються для імуномодуляції та прискорення реконвалесценції. Серед виробників – українські та закордонні компанії (Болгарія, Польща).

Комбіновані добавки, такі як Полібіозим або Ензібар Інфламаза, включають кілька ферментів для синергетичного ефекту, зокрема бромелаїн та папаїн посилюють розщеплення білків, рутин стабілізує судини. У Лібоксазі наттокіназа додає антикоагулянтні властивості, корисні для серцево-судинної системи, але вимагає обережності при кровотечах. Юнона Фармліга виділяється рослинними екстрактами для жіночого здоров'я, з резвератролом від гірчака для антиоксидантного захисту.

Високий рівень споживання серратіопептидази зумовлений її доведеними протизапальними властивостями. Проте доцільність застосування ферменту в специфічних протоколах (зокрема, при реабілітації пацієнтів із постковідним синдромом) потребує подальшої валідації в межах рандомізованих клінічних досліджень. З огляду на потенційні лікарські взаємодії та наявність протипоказань, використання будь-яких форм серратіопептидази має відбуватися за умови попередньої консультації з профільним фахівцем.

Висновок до розділу 1

Ензимотерапія є перспективним напрямком сучасної медицини, особливо для лікування хронічних запальних захворювань, онкології, серцево-судинних розладів та генетичних патологій, де ферменти, такі як серратіопептидаза, демонструють високу селективність та ефективність,

перевершуючи традиційні НПЗП за профілем безпеки, хоча існують певні обмеження, такі як імуногенність та нестабільність, що вимагають продовження досліджень.

Серратіопептидаза, як цинк-вмісна металопротеаза з молекулярною масою 45–60 кДа, має оптимальні умови активності (рН 9, 40 °С) та зв'язується з α -2-макроглобуліном, що забезпечує її стабільність у біологічних рідинах, роблячи її ідеальним кандидатом для системної терапії.

Фармакологічні властивості серратіопептидази, включаючи протизапальну (інгібування ЦОГ-I/II, регуляція цитокінів), антибіоплівкову (руйнування матриксу, посилення антибіотиків), ранозагоювальну (гідроліз медіаторів, покращення мікроциркуляції) та фібринолітичну дії, підтверджені численними *in vitro*, *in vivo* та клінічними дослідженнями, відкривають широкі терапевтичні перспективи, від артриту до постковідних ускладнень.

Сучасні стратегії доставки серратіопептидази, такі як наночастинки, ліпосоми, мікросфери та гідрогелі, вирішують проблеми низької biodostupnosti та деградації, забезпечуючи контрольоване вивільнення та локальну дію, з ефективністю захоплення до 96% та пролонгованим ефектом до 24–32 годин.

Аналіз українського ринку показує залежність від імпорту субстанції, з переважанням пероральних форм (таблетки, капсули) без інноваційних систем доставки, що обмежує ефективність та створює перспективи для розвитку вітчизняного виробництва субстанції та впровадження передових технологій для посилення фармацевтичної незалежності.

РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Характеристика методів дослідження

Для розкриття теми дослідження та реалізації завдань використовувались аналітичні методи опрацювання інформації з наукових джерел - пошук і скринінг літературних даних, критичний аналіз і відбір релевантних джерел, порівняльний аналіз отриманих відомостей, їх узагальнення та систематизацію. Під час дослідження застосовувалися методи аналізу та синтезу, індукції й дедукції, абстрагування, логічного узагальнення та класифікації, а також інтерпретація та концептуалізація наукових результатів, представлених у дослідженнях.

За аналізом наукових публікацій нами було виокремлено методи дослідження, що використовуються дослідниками для роботи із ізоляції, ідентифікації, вивчення властивостей, культивування перспективних штамів продуцентів серратіопептидази, їхньої модифікації, а також відпрацювання технології [9, 11, 22, 42-55]. Методи базуються на стандартних мікробіологічних, біохімічних, молекулярних, статистичних підходах, адаптованих з наукової літератури

Ізоляцію штамів проводять з природних джерел, таких як ґрунт, кишечник комах (наприклад, шовкопряда *Bombyx mori*), ендofіти рослин (*Morus rubra*), рибні відходи або поверхневі води. Зразки збагачують у селективних середовищах, наприклад, на агаризованому середовищі з казеїном для первинного скринінгу на протеазну активність. Бактерії виділяють шляхом посіву на MacConkey агар або кров'яний агар, де колонії *Serratias pp.* (типові продуценти) проявляють характерний червоний пігмент (продігіозин) при температурах нижче 30 °С. Чисті культури отримують шляхом серійних розведень і пересівами на щільні середовища. Для підтвердження відсутності контамінації застосовують мікроскопію

(грамнегативні палички розміром $0,5\text{--}0,8 \times 0,9\text{--}2,0$ мкм) та біохімічні тести (оксидаза-негативні, ферментують глюкозу з газоутворенням).

Ідентифікацію проводять комбінацією морфологічних, біохімічних та молекулярних методів. Морфологічна ідентифікація включає оцінку колоній (слизисті, червонопігментовані на щільних середовищах при $25\text{--}30$ °C), рухливості клітини (перитрихіальні джгутики) та грамфарбування. Біохімічні тести: позитивні на каталазу, негативні на оксидазу; ферментація лактози на MacConkey агару; позитивна реакція на DNase, ліпазу та желатиназу. Молекулярна ідентифікація базується на ампліфікації та секвенуванні гена 16S rRNA (універсальні праймери 27F і 1492R). Отримані послідовності порівнюють з базами даних NCBI за допомогою BLAST, з порогом подібності $>98\%$ для підтвердження виду *S. marcescens*. Для розрізнення штамів застосовують RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-PCR) або WGS (Whole Genome Sequencing) для оцінки філогенетичного положення та капсульних типів.

Культивування для більшості продуцентів, які вважаються перспективними, зокрема для штамів *Serratias pp.*, проводять глибинною ферментацією в аеробних умовах. Оптимальні середовища: соєво-казеїновий бульйон або бульйон з триптоном, дріжджовим екстрактом та глюкозою з додаванням казеїну ($0,5\text{--}3\%$), глюкози ($1\text{--}3\%$) та екстракту яловичини. pH середовища - $7\text{--}9$, температура - $28\text{--}37$ °C, тривалість - $24\text{--}48$ год при аерації $150\text{--}240$ об/хв. Для оптимізації застосовують статистичні методи: зміни одного фактора (One-Factor-At-a-Time, OFAT) для скринінгу вуглецевих (глюкоза, гліцерин) та азотних джерел (казеїн, пептон), а потім поверхні відгуку (Response Surface Methodology, RSM) з Box-Behnken дизайном для оптимізації складних багатофакторних процесів (pH, температура, концентрація субстратів). Для масштабування використовують біореактори з контролем волюметричного масопереносу кисню (k_{La} - $25\text{--}30$ год $^{-1}$) у періодичному режимі з підпиткою для досягнення високої щільності клітин (до $10\text{--}20$ г/л біомаси) [26, 29–31, 34, 36, 39, 54].

У деяких дослідженнях наводяться відомості про використання методів твердофазної ферментації, зокрема для штаму *Streptomyces hydrogenans* var. MGS13, виділеного з ґрунту мангрових дерев, що володіє високою здатністю продукувати фібринолітичні ферменти, після чого неочищений фермент отримували шляхом екстракції буфером натрій борату (рН 9,0), очищення проводили гель-фільтрацією [42].

Визначення загальної кількості білка. Загальну кількість білка в культуральній рідині або лізатах визначають спектрофотометричними методами. Основний метод - Лоурі (з використанням реактиву Фоліна-Чокальтеу), де білок реагує з Cu^{2+} у лужному середовищі, а вивільнений тирозин дає забарвлення при 750 нм. Стандарт - бичачий сироватковий альбумін (BSA) у діапазоні 5–45 мкг/мл. Альтернативи: метод Бредфорда (з барвником Кумаси бриліантовий синій G-250, вимірювання при 595 нм) для швидкого аналізу або біцинхоніною кислотою (BCA, bicinchoninic acid) для точного визначення в присутності детергентів (вимірювання при 562 нм). Результати виражають у мг/мл.

Визначення протеазної активності. Протеазну активність серратіопептидази визначають за гідролізом казеїну (0,65–0,75% розчин у Tris-буфері, рН 8,5–9,0). Реакцію проводять при 37–40 °С протягом 30 хв, зупиняють трихлороцтовою кислотою (ТСА), фільтрують і вимірюють вивільнений тирозин за методом Лоурі. Одиниця активності (1 Од) – кількість ферменту, яка вивільняє 1 мкмоль тирозину за 1 хвилину. Це стандартний показник потужності препарату.

Альтернативою є використання азоказеїнового тесту, який показує, наскільки сильним є отриманий фермент. Використовують як субстрат 0,5% азоказеїн - білок казеїн, до якого приєднано барвник. Коли фермент (серратіопептидаза) розщеплює казеїн, барвник вивільняється у розчин. Умови: Tris-буфер (рН 8,5) забезпечує лужне середовище, яке є оптимальним для цього ферменту. Температура 37°C і час 30 хв - стандартні умови для імітації фізіологічної дії. Після зупинки реакції (зазвичай трихлороцтовою

кислотою) вимірюють інтенсивність забарвлення (660 нм). Чим більше тирозину вивільнилося, тим вища активність.

Також можливе використання вискоєфективної рідинної хроматографії (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) для підтвердження активності (утримання $4,66 \pm 0,10$ хв порівняно зі стандартом). Кінетику оцінюють за Міхаеліс-Ментен ($K_m - 1,66$ мг/мл, V_{max} 319–33 333 Од/мл). Для скринінгу застосовують зімографію на казеїновому агарі або імуноферментний аналіз (ELISA) для кількісного аналізу.

У розрізі виробництва ферментних препаратів, зокрема серратіопептидази, важливим є розрізняти поняття Од/мл (U/ml) та ЕОд/мл (EU/mg).

Одна одиниця (U) зазвичай визначається як кількість ферменту, яка каталізує перетворення 1 мікромоля субстрату (наприклад, казеїну) за хвилину в стандартних умовах; це показник активності ферменту (врожайності) на одиницю об'єму. У контексті серратіопептидази це означає загальну продуктивність культури бактерій у виробництві активного ферменту.

Одна ензиматична одиниця (EU) – це специфічна активність ферменту (Enzyme Units) на міліграм білка, вказує на чистоту та ефективність очищеного ферменту, де вища цифра означає, що менша маса білка дає більшу активність. Для серратіопептидази одиниця базується на вивільненні тирозину з казеїну. Специфічна активність оцінює чистоту після очищення (наприклад, преципітація, хроматографія). Вища EU/mg (наприклад, після Sephadex) вказує на ефективне видалення домішок. Для серратіопептидази стандарт: 10 мг = 20 000 U активності [42, 43].

Методи мутагенезу для покращення продуктивності. Для отримання надпродуцентів застосовують фізичний (UV-опромінення) та хімічний мутагенез (EMS - етилметилсульфонат). UV-мутагенез: культури опромінюють UV-світлом (254 нм) протягом 20–60 с, виживаємість - 1–10%. EMS-мутагенез: обробка 0,1–1% EMS протягом 30–60 хв при 37 °С. Комбінований мутагенез (UV + EMS) дає кращі результати (зростання

активності на 20–300%). Мутанти скринінгують на казеїновому агару за зонами гідролізу. Стабільність перевіряють через 5–10 пасажів.

Рекомбінантне виробництво сerratіонептидази. Для уникнення патогенності *S. marcescens* застосовують гетерологічну експресію в *E. coli* (наприклад, штам BL21(DE3)) з векторами pET-28b, pET-SUMO або pPICZαA (для *Pichia pastoris*). Ген сerratіонептидази (1464 нт, SEQ ID NO: 2) клонують під T7-промотором. Індукція IPTG (0,1–2 мМ) при OD₆₀₀ 0,6–0,8, температура 16–37 °С, тривалість 2–16 год. Вираження як ф'южн-білка (SUMO-тег) для уникнення токсичності. Очищення: лізис клітин, солюбілізація тілець включення (8 М сечовина), рефолдинг (діаліз у буфері з Ca²⁺) та хроматографія (MonoQ, Q-Sepharose). Вихід: 40–86 мг/л, активність 8382 Од/мг. Для масштабування - ферментація з підпиткою та автоіндукцією.

Методи оптимізації біотехнологічних процесів.

OFAT (One-Factor-At-A-Time) – класичний метод оптимізації, де один фактор (наприклад, температура, рН або концентрація субстрату) змінюється поетапно, тоді як інші залишаються постійними. Це дозволяє оцінити вплив кожного фактора окремо. У проаналізованих дослідженнях OFAT застосовувався для скринінгу джерел вуглецю/азоту, температури та рН, що допомогло виявити базові оптимальні значення (наприклад, глюкоза 3 г/л як найкраще джерело вуглецю з активністю 4022,6 Од/мл [43]). Перевагами методу є простота, низька кількість експериментів; недоліками - ігнорування взаємодії факторів, що може призводити до субоптимальних результатів. Забезпечує оптимізацію шляхом поступового покращення, але не є ефективним для складних систем.

RSM (Response Surface Methodology) - статистичний метод для моделювання та оптимізації процесів з урахуванням взаємодій факторів. Використовує дизайни експериментів (наприклад, Вох-Behnken), де фактори варіюються одночасно, а результати апроксимуються квадратичною моделлю ($Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j$). Зазвичай у дослідженнях RSM застосовується після OFAT для тонкої оптимізації (наприклад, глюкоза,

екстракт яловичини, рН, що підвищило активність на 63,65% (до 6516,4 Од/мл [43]). Із переваг можна виділити наступні: враховує взаємодії (наприклад, синергію глюкози та рН), генерує 3D-графіки для візуалізації оптимуму; серед недоліків: потребує більше експериментів. Метод забезпечує оптимізацію шляхом математичного моделювання, мінімізуючи кількість проб і максимізуючи ефективність процесу.

Fox-Behnken design (BBD) – статистичний дизайн експериментів у рамках методології поверхні відгуку (RSM), призначений для оптимізації процесів з мінімальною кількістю випробувань. Він використовує три рівні для кожного фактора (низький, середній, високий) і розміщує точки на серединах граней куба, уникаючи крайніх комбінацій (кутів). Для k факторів кількість експериментів – $2k(k-1) + C$, де C – кількість центральних точок (зазвичай 3–5). BBD ефективний для квадратичних моделей, враховує взаємодії факторів, але не включає аксіальні точки, на відміну від Central Composite Design. Застосовується в біотехнології, хімії та інженерії для моделювання (наприклад, $Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j$).

Використання цих методів на вітчизняному підприємстві, забезпечить комплексне вивчення штамів, дозволяючи розробити та оптимізувати вітчизняне виробництво серратіопептидази. Подальші дослідження передбачають валідизацію на промисловому рівні.

2.2 Характеристика продуцентів серратіопептидази

Найтипівішим продуцентом серратіопептидази є *Serratia marcescens*, яка є природним продуцентом ферменту. Пізніше гомолог цього ферменту також був виявлений у деяких родів грамнегативних та грампозитивних бактерій, таких як *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Erwinia chrysanthemi*, *Xenorhabdus*, *Deinococcus radiodurans* та *Bacillus subtilis* [44 – 48]

Serratia marcescens є факультативно-анаеробною грамнегативною паличкою, що належить до родини *Yersiniaceae* порядку *Enterobacterales*.

Історія вивчення мікроорганізму бере початок у 1819 році, коли Бартоломео Біціо ідентифікував його як причину появи червоних плям на продуктах харчування.

Serratia marcescens є типовим представником *Enterobacteriaceae*, являючи собою грамнегативні палички з перитрихіальними джгутиками, що забезпечують рухливість. Під мікроскопом спостерігаються як короткі прямі або злегка вигнуті палички розміром $0,5\text{--}0,8 \times 0,9\text{--}2,0$ мкм, часто в парах або ланцюжках (рис. 2.1).

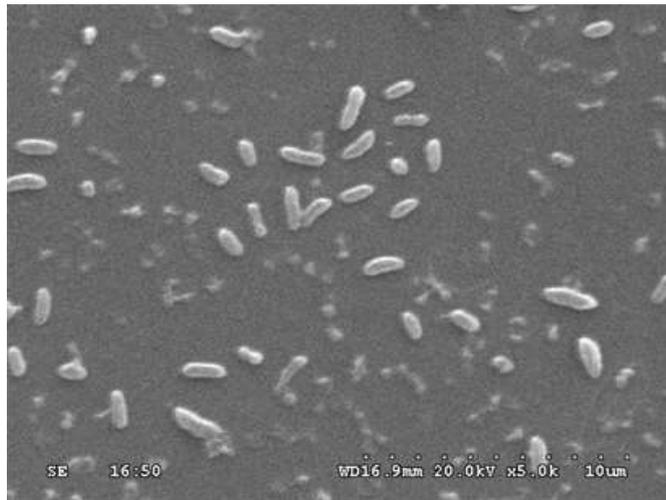


Рис. 2.1 - Скануюча електронна мікроскопія *Serratia marcescens*
(Ілюстрація взята з [49])

Колонії на агаризованих середовищах великі, слизисті, з характерним червоним пігментом (продігіозин) при температурах нижче 30°C , що зникає при вищих температурах. *S. marcescens* демонструє високу адаптивність, виживаючи в умовах обмеженого вмісту поживних речовин, сольових розчинів та при впливі дезінфектантів. Ріст активний на стандартних середовищах, наприклад MacConkey агар або кров'яний агар, із червоним забарвленням (рис. 2.2). Оптимальні умови: температура $28\text{--}37^{\circ}\text{C}$, рН 7–9, факультативний анаеробізм з кращим аеробним ростом. Ці властивості роблять її легко культивованою в лабораторних умовах, але вимагають контролю для уникнення контамінації. Оптимальна температура для продукції характерного пігменту продігіозину становить $25\text{--}30^{\circ}\text{C}$, тоді як при 37°C

синтез пігменту зазвичай пригнічується, що пояснює відсутність забарвлення у більшості клінічних ізолятів. У рідких середовищах формує рівномірну каламуть або плівку. Для виробництва серратіопептидази використовують середовища на основі глюкози 1–3%, казеїну 0,5–3%, екстракту яловичини, з інкубацією 24–48 год при 30–37°C. Оптимізація ферментації підвищує врожай на 60–300%, з утворенням біоплівки, що ускладнює ферментацію, але полегшує очищення екстрацелюлярного ферменту.



Рис. 2.2 – Ріст пігментуючої бактерії *S. marcescens* на різних щільних поживних середовищах (Ілюстрація взята з [56])

Екологічно поширена в ґрунті, воді, на рослинах та комах (рис. 2.3).

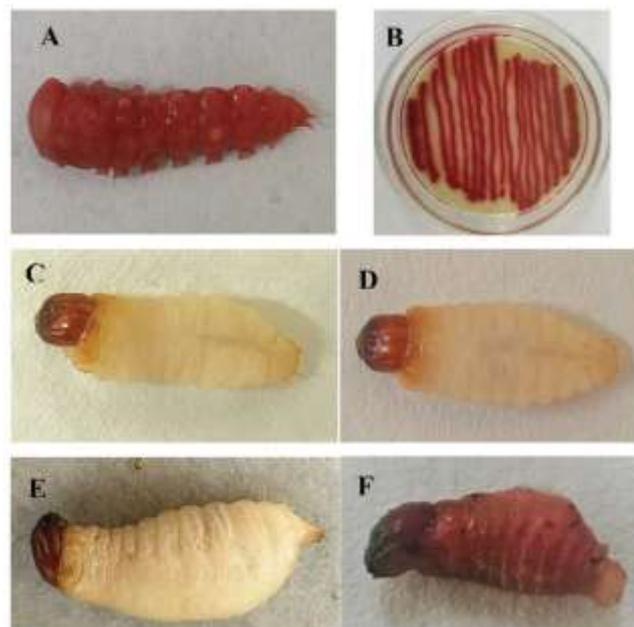


Рис. 2.3 – Інфікування червоного пальмового довгоносика *Rhynchophorus ferrugineus* бактерією *Serratia marcescens* (Ілюстрація взята з [57])

Патогенний потенціал *S. marcescens* базується на скоординованій дії низки факторів, що забезпечують адгезію, інвазію та ухилення від імунної відповіді господаря [58].

Ключовими детермінантами агресії є гемолізینی, позаклітинні протеази, нуклеази та ДНКазі. Серед гемолізинів бактерії відмічають ShlA та PhlA. Пороутворюючий токсин ShlA викликає лізис еритроцитів та імунних клітин, а фосфоліпаза PhlA пошкоджує клітинні мембрани, забезпечуючи бактерію поживними речовинами. Позаклітинні протеази сприяють деградації білків тканин та імуноглобулінів, провокуючи запальні реакції. Нуклеази та ДНКазі допомагають патогену уникати пасток нейтрофілів (NETs).

У забезпеченні патогенності задіяні системи секреції I, IV та VI типів. Особливе значення має T6SS, яка функціонує як молекулярний шприц для введення токсичних ефекторів у клітини конкурентів. Це забезпечує виду домінування в полімікробних спільнотах та біоплівках. Здатність до утворення біоплівок є критичним фактором персистенції *S. marcescens* у лікарняному середовищі. Процес формування проходить п'ять стадій - від початкової оборотної адгезії (опосередкованої фімбріями 1 типу) до дозрівання тривимірної архітектури та подальшої дисперсії планктонних клітин.

Важливу роль у стабілізації матриксу відіграє позаклітинна ДНК та екзополісахариди. Регуляція розвитку біоплівки здійснюється через систему кворум-сенсингу SmaI/SmaR, що залежить від концентрації N-ацилгомосеринлактонів. Дослідження показують, що позаклітинний протеоліз (зокрема металопротеїназа PrtA) є необхідним для оновлення джгутиків та формування зрілої структури біоплівки.

Проблема лікування інфекцій, спричинених *S. marcescens*, ускладнюється поєднанням внутрішньої (вид природно стійкий до поліміксинів (колістину), пеніцилінів та макролідів) та набутої резистентності, що особливо небезпечно для пацієнтів з ослабленим імунітетом та тих, хто перебуває у відділеннях інтенсивної терапії. До механізмів набутої

резистентності відносяться мобільні генетичні елементи, включаючи плазміди, транспозони та інтегрони, що несуть гени резистентності.

Незважаючи на патогенність, *S. marcescens* є цінним об'єктом біотехнології не тільки завдяки продукції фермента серратіопептидази, а й інших ферментів – хітинази, ліпази та ДНКаз, які широко застосовуються в сільському господарстві, харчовій промисловості та біоремедіації [50]. Деякі штами сприяють росту рослин та пригнічують патогени завдяки протигрибковій та нематоцидній дії [51]. Бактерія також може розкладати вуглеводні, текстильні барвники та поглинати важкі метали, що робить її цінною для очищення стічних вод [59]. Цікавим та корисним для людини метаболітом *S. marcescens* є пігмент продигіозин, який відповідає за забарвлення середовища у червоно-помаранчевий колір, демонструє потужні цитотоксичні властивості проти ракових клітин та є перспективною субстанцією для розробки лікарських засобів [60].

Таким чином, *S. marcescens* є універсальною бактерією з екологічною адаптивністю, що зробило її ідеальним продуцентом серратіопептидази. Промислове виробництво серратіопептидази почалося із природного штаму *S. marcescens* E-15 (ATCC 21074) виділеного з кишечника шовкопряда *Bombyx mori* L. – природного середовища, де бактерія продукує фермент для розчинення кокона. Takeda Chemical Industries Ltd. (зараз Takeda Pharmaceutical Company Limited) комерціалізувала фермент як препарат Danzen (serrapeptase), запущений на ринку Японії у 1968 році для протизапальної терапії. Препарат Danzen швидко набув популярності як альтернатива НПЗП, але в 2011 році Takeda добровільно відкликкала його з японського ринку через сумніви в ефективності за новими даними клінічних випробувань.

Цей штам започаткував промислове виробництво серратіопептидази. Культивування дикого продуцента проводилось в умовах глибинної ферментації з використанням джерел вуглецю (глюкоза та гліцерин), азоту (екстракт яловичини та казеїн), при рН 7–9 та 30–37°C протягом 24–48 годин.

Оптимізації через статистичні методи підвищили активність на 60–300%. Позаклітинна секреція ферменту в диких штаммах є позитивним фактором, що полегшує виділення та очищення ферменту у промислових умовах (преципітація, хроматографія). Але наявність факторів патогенності у природного продуцента, ризику самопротеолізу ферменту та низька біодоступність обумовили постійний пошук безпечних штамів серед різних природних умов. Прагнення отримати продуценти *S. marcescens* із підвищеною врожайністю також обумовили розробку мутантних штамів (отримані УФ-опроміненням чи хімічними мутагенами, наприклад, етилсульфонат). У табл. 2.1 представлено перелік природних та мутагенних штамів *S. marcescens*, що знаходяться на різних етапах використання як продуценти серратіопептидази [52-55], продуктивність штамів (активність та біомаса) буде проаналізована у розділі 3.

Таблиця 2.1 – Приклади штамів продуцентів *S. marcescens* серрітіопептидази

Штам	Місце виділення	Виділення	Ключові властивості	Умови культивування та подальшого очищення
E-15	Кишечник шовкопряда (<i>Bombyx mori</i>), Японія	1960-ті	Оригінальний комерційний; опортуністичний патоген; позаклітинна секреція	37°C, pH 7.3 триптон соєвий бульйон
VS56	Ґрунт (відходи рибного ринку), Індія	2024	Високоврожайний ізолят; непатогенний варіант; помірно термостабільний (УФ-мутагенез); висока протизапальна активність (97%)	37°C, pH 7.5, глюкоза 3 г/л, екстракт яловичини 3 г/л; Середовища на основі пептону-гліцерину; pH 7, 37°C, 24 год
C8	Кишечник шовкопряда, Індія	2024	Ендосимбіотичний; антибіоплівковий	30°C, pH 7, 1.5% лялечок шовкопряда, 0.1% казеїн, 0.1% соєва олія, 0.5% (NH ₄) ₂ HPO ₄ , 0.01% ZnCl ₂ , 0.2% CaCl ₂ ·2H ₂ O, спільне виробництво з хітиназою для синергії
MES-4	Ендofіт листя <i>Morus rubra</i> шовковиця, Індія	2020	Ендofітний; Непатогенний; рослинно-асоційований	Соєво-казеїновий дигест; pH 7, 28°C, 36 год;
AD-W2	Ґрунт (Північно-Західні Гімалаї), Індія	2021	Термостабільний мутант (УФ/хімічний мутагенез); висока стабільність при 50°C	Середовища на основі гліцерину; pH 9, 50°C, 48 год; особливості: 2-кратне збільшення врожаю через мутагенез; придатний для промислових теплових процесів
VITSD2	Кишечник шовкопряда, Індія	2010-ті	Симбіотичний; антивірусний потенціал	Середовища на основі пептону-гліцерину; pH 7, 37°C, 24 год
MTCC 7298	Колекція IMTECH, Чандігарх, Індія	2019	Лабораторний; екстрацелюлярні протеази	37°C, pH не вказано, 2YT broth
LL-413	Кокони шовкопряда, Ханчжоу, Китай	2015	Швидке зростання; високий врожай у ферментері	28-32°C, pH 7.5-8.5, дріжджовий екстракт 5-11 г/л, екстракт яловичини 3-6.6 г/л, екстракт солоду 10-12.2 г/л, MgSO ₄ 1 г/л, NaCl 5 г/л
NRRL B 23112	Колекція NRRL, США	2016	Промисловий; високоочищений фермент	Особливість отриманого ферменту: оптимум pH 10,0, температурний оптимум 42°C, ізоелектрична точка 6,1.

Для подолання означених вище проблем також перспективними є пошук можливих продуцентів серед інших видів мікроорганізмів та дослідження рекомбінантних систем для синтезу серратіопептидази, що знаходяться на різних етапах дослідження та впровадження (табл. 2.2).

Процес розробки ефективних систем експресії серратіопептидази пройшов шлях від ідентифікації проблем позаклітинної секреції до оптимізації векторних систем. Перші спроби клонування гена *S. marcescens* E-15 у вектор pTSP26 із подальшою експресією в *E. coli* JM 103 у 1986 році продемонстрували локалізацію цільового ферменту виключно всередині клітин господаря, без його виходу в культурне середовище [61]. Аналогічні труднощі спостерігалися при використанні штаму *S. marcescens* SM6 під контролем lac-промотора – попри успішну секрецію, фермент залишався неактивним і мав збільшену молекулярну масу [62]. Окрему проблему становить формування агрегатів білка. Зокрема, при використанні вектора pET32a (+) у штамі *E. coli* (DE3)/pLysS серратіопептидаза експресувалася у вигляді неактивних тілець включення [63].

Аналіз цих результатів дозволив припустити, що низька ефективність секреції в системах *E. coli* зумовлена відсутністю кластеризації генів секреції *S. marcescens* поблизу структурного гена ферменту або порушенням механізмів процесингу зимогену протеази в клітинах гетерологічного господаря [64].

Значного прогресу було досягнуто завдяки застосуванню векторів серій pET28 та pJET. Клонування гена у вектор pET28b з експресією в *E. coli* BL21 дозволило уникнути утворення тілець включення та забезпечити коректну секрецію рекомбінантного білка в позаклітинний простір [22]. Дослідження системи на основі вектора pJET 1.2 у штамі *E. coli* DH5- α підтвердили стабільність клонування. Аналіз послідовності виявив відкриту рамку зчитування обсягом 1464 нуклеотиди, що демонструє повну гомологію з металопротеазою серралізином штаму *S. marcescens* 2170 [65].

Альтернативним напрямком є використання еукаріотичних систем експресії. Клонування гена серратіопептидази у вектор pPICZ α A з подальшою електропорацією в дріжджі *Pichia pastoris* GS115 дозволило досягти піку експресії через 72 години [66]. Це підтверджує, що дріжджові системи можуть бути ефективною альтернативою бактеріальним культурам для промислового отримання функціонально активного ферменту.

Таблиця 2.2 – Характеристика штамів продуцентів серртіопептидази, що знаходяться на різних етапах розробки

Штам-продуцент	Місце виділення	Ключові особливості	Біологічні властивості	Етап впровадження	Умови культивування та особливості виробництва
<i>Serratia indica</i>	Ґрунт (Індія)	Альтернатива <i>S. marcescens</i> ; нижча патогенність	Активність ~25 ОД/мл; подібна до E-15; протизапальна	Порівняльні дослідження; лабораторна оптимізація	Середовища на основі казеїну; рН 7,5, 30°C, 48 год; особливості: порівняний врожай; безпечніший для харчових застосувань
<i>Serratia piscatorum</i>	Кишечник риби (Індія)	Водний ізолят; різноманітність ферментів	Активність 12 ОД/мл; муколітичні властивості	Ранній біопошук; водні моделі	Бульйон з екстрактом риби; рН 8, 28°C, 36 год; особливості: специфічний для ніші; потенціал для морської біотехнології
<i>Serratia plymuthica</i>	Ґрунт/ризосфера рослин (Індія)	Асоційований з ризосферою; стимуляція росту рослин	Активність 20 ОД/мл; властивості PGPR; стабільність при рН 7–9	Сільськогосподарські дослідження; польові випробування	Середовища, що імітують ризосферу; рН 7, 30°C, 48 год; особливості: подвійне використання (фермент + біодобриво); екологічно стійкий
<i>Chryseobacterium amylolyticum</i> VS10	Ґрунт (відходи рибного ринку, Індія)	грамнегативний; безпечна альтернатива	Активність 12 ОД/мл; протизапальний (94%); МВ ~50 кДа	Початковий скринінг; оцінки безпеки	Глюкоза-екстракт яловичини; рН 7, 37°C, 24 год; особливості: нижчий врожай, але непатогенний; легке масштабування
<i>Kocuria rosea</i> VS18	Ґрунт (Індія)	Грампозитивний; продукує пігмент; стійкий до УФ	Активність 15 ОД/мл; синергія антиоксидантів; оптимальний рН 8	Біопошук; спільне виробництво пігментів	Поживне середовище; рН 7,5, 30°C, 48 год; особливості: барвисті побічні продукти; потенціал для косметичних застосувань
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	Рекомбінантний	Господар для гетерологічної	Високий врожай (86 мг/л); ф'южн-теги (наприклад,	Просунутий; виробництво	Середовище LB + індукція IPTG; рН 7, 37°C, 16–24 год; особливості: ферментація з

		експресії; непатогенний	SUMO); контрольована активність		підпиткою (до 10 г/л біомаси); внутрішньоклітинний фермент, вимагає лізису/очищення
<i>Escherichia coli</i> JM109	Рекомбінантний	Стабільне утримання плазмід; висока експресія	Активність 50–70 ОД/мл; самопротеолітичне дозрівання	Пілотний проект; дослідження оптимізації	Поживний бульйон; рН 7, 30°C, 20 год; особливості: автоіндукція; врожай 40–60 мг/л; дозрівання без тегів
<i>Pichia pastoris</i>	Рекомбінантний	Евкаріотичний господар; глікозилювання	Нижчий врожай, ніж у <i>E. coli</i> ; секретований; евкаріотичний фолдинг	Лабораторні дослідження	YPD/гліцерин-метанол; рН 6, 28°C, 72 год; особливості: індукція метанолом; позаклітинний (легкий збір); придатний для фармацевтичного застосування
<i>Bacillus subtilis</i>	Рекомбінантний	Статус GRAS; утворення спор	Активність ~30 ОД/мл; стійке зростання	Промислові випробування; фокус на харчовій безпеці	Середовища на основі соєвого шроту; рН 7, 37°C, 48 год; особливості: стабільність спор; ферментація високої щільності; позаклітинний фермент
<i>Lactococcus lactis</i>	Рекомбінантний	Харчовий рівень; пробіотичний	Низький врожай (10–20 ОД/мл); безпечний для пероральної доставки	Дослідницький; пробіотичні вектори	Середовище M17 + нізин; рН 6,5, 30°C, анаеробний; особливості: індукований нізином
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Рекомбінантний	Холодоадаптований; висока розчинність	Активність 25 ОД/мл; розчинна експресія	Лабораторний масштаб; дослідження розчинності	Середовище King's B; рН 7, 25°C, 48 год; особливості: низькотемпературний, зменшує включення
<i>Streptomyces lividans</i>	Рекомбінантний	Актиноміцет; висока секреція	Активність 15–25 ОД/мл; глікозилюваний	Дослідження; оптимізація секреції	TSB середовище; рН 7,2, 28°C, 72 год; особливості:

					сильні промотори; позаклітинний для біофарми
<i>Aspergillus niger</i>	Рекомбінантний	Грибний господар; висока біомаса	Низький врожай; гіпер- глікозильований	Ранні дослідження	Картопляне декстрозне середовище; рН 5, 28°C, 96 год; особливості: кислий оптимум; спільне виробництво з амілазами
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Рекомбінантний	Дріжджі; легка генетика	Активність 10–15 ОД/мл; гіпер- манозильований	Попередній; модельний організм	YPD; рН 6, 30°C, 48 год; особливості: промотор GAL1; потенціал для хлібопекарських спільних застосувань
<i>Serratia rubidaea</i>	Вода/грунт (Індія)	Червоно- пігментований; екологічний	Активність 18 ОД/мл; подібна до <i>S. marcescens</i>	Етап виділення; дослідження пігментів	Поживний бульйон; рН 7, 30°C, 36 год; особливості: спільний продукт протігіозин
<i>Serratia nematodiphila</i>	Симбіонт нематоди (Індія)	Симбіотичний; контроль комах	Активність 12 ОД/мл; ентомопатогенний	Дослідження біоконтролю; лабораторний	Середовища на основі комах; рН 7,5, 28°C, 48 год
<i>Serratia proteamaculans</i>	Рослина/грунт (Індія)	Протеолітична різноманітність	Активність 20 ОД/мл; широкий субстрат	Порівняльна протеоміка; лабораторний	Казеїновий агар; рН 8, 37°C, 24 год; особливості: множинні протеази; варіабельність врожаю
<i>Serratia liquefaciens</i>	Молочні продукти/грунт (Індія)	Бактерія псування; холодоактивний	Активність 15 ОД/мл; температура 4– 40°C	Попередні дослідження, Харчова біотехнологія	Середовище з молоком; рН 7, 20°C, 72 год; особливості: психротолерантний

Висновок до розділу 2

Основними продуцентами серратіопептидази є штами *Serratia marcescens* - факультативно-анаеробні грамнегативні мікроорганізми з високою адаптивністю, поширені у ґрунті, воді, на рослинах та в симбіозі з комахами (наприклад, шовкопряд *Bombyx mori*). Ключові штами, такі як E-15 (оригінальний комерційний, виділений з кишечника шовкопряда), VS56 (ґрунтовий ізолят з високою продуктивністю), AD-W2 (термостабільний мутант) та рекомбінантні системи в *E. coli* BL21 або *Pichia pastoris*, демонструють варіабельність врожаю (від 55 до 65000 Од/мл) та властивостей (протеазна активність, стабільність при рН 7–9 та 28–37 °С). Патогенний потенціал (фактори вірулентності, біоплівки, резистентність) робить дикі штами ризикованими, тому перспективними є непатогенні альтернативи – штами, виділені з природних екосистем та рекомбінантні платформи для безпечного промислового виробництва. Загалом, об'єкти дослідження відкривають можливості для біотехнологічних застосувань не тільки в ензимотерапії, а й у сільському господарстві, біоремедіації та виробництві метаболітів (продігіозин, хітинази).

РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1. Оптимізація складів живильних середовищ для культивування продуцентів

Основним продуцентом серратіопептидази є штами *Serratia marcescens*. Також на різних етапах дослідження та впровадження знаходяться штами інших мікроорганізмів, мутантні та рекомбінантні штами, розглянуті у розділі 2. Але, окрім вибору відповідних мікроорганізмів для виробництва ферментів, які повинні мати відповідну каталітичну специфічність та бажані фізичні властивості, кінцевий вихід цільового продукту визначають середовище для росту та умови проведення процесу.

Багаті на білок поживні середовища, зокрема казеїн, пептон, триптон, желатин або знежирене молоко, є оптимальними для стимуляції синтезу протеаз, оскільки вони ефективно виступають індукторами. Низка досліджень підтверджує значне підвищення рівня протеазної активності саме в таких середовищах. Окрім того, індуючу дію можуть проявляти й інші сполуки, наприклад амінокислота лейцин. Водночас біосинтез протеаз може суттєво пригнічуватися деякими компонентами середовища, зокрема гліцерином. Крім того, активність протеаз регулюється за допомогою специфічних активаторів та інгібіторів. Це все враховується при виборі живильних середовищ, тому для вирощування штамів *S. marcescens* традиційно використовувався триптиказеїно-соєвий бульйон (Trypticase Soy Broth, TSB), який наразі у дослідженнях застосовується як середовище порівняння та для вивчення протеазної активності перспективних ізолятів (склад – казеїновий пептон 17 г/л та соєвий пептон 3 г/л (джерела органічного нітрогену), натрію хлорид 5 г/л, калію дигідрофосфат 2,5 г/л, глюкоза 2,5 г/л (джерело вуглецю), рН – $7,3 \pm 0,2$).

Для підвищення виходу ферменту проводять оптимізацію, зокрема і через розроблення низки спеціалізованих середовищ. Надійними методами

оптимізації процесів, які успішно використовуються для вивчення впливу багатьох факторів на виробництво протеолітичних ферментів, є факторний дизайн та методологія поверхні відгуку. Встановлено, що оптимізація джерел вуглецю використанням мальтози забезпечує значно вищий вихід продукту. Зокрема, середовище із мальтозою та гліцерином, як джерелами вуглецю, пептоном, як джерела органічного нітрогену, амонію сульфату, як джерела неорганічного нітрогену, із додаванням неорганічних солей (калію дигідрофосфату, натрію бікарбонату, натрію ацетату) та аскорбінової кислоти, як стабілізатора, (вміст всіх компонентів по 10 г/л), при глибинній ферментації штаму *S. marcescens* ATCC 13880 (рН 7,0, 37 С, 24 год) забезпечувало вихід серратіопептидази на рівні 27,36 Од/мл (у 1,5 рази вище базового неоптимізованого середовища) [67]. При збільшенні кількості мальтози до 45 г/л (інші компоненти середовища – соєве борошно 65 г/л, калію дигідрофосфату 8,0 г/л, натрію хлориду 5,0 г/л) культивування *S. marcescens* NRRL B-23112 забезпечувало вихід ферменту після очищення на рівні 7333 ЕОд/мл (у 17 разів вище, ніж на базовому неоптимізованому середовищі) [68].

Важливим фактором оптимізації середовищ є джерела органічного нітрогену, зокрема використання різних комбінацій триптона, соєвого борошна, пептона. Так, при використанні комбінації триптичного соєвого бульйону (30 г/л) та знежиреного молока (5% мас./об.) (TSB-SM) при культивуванні штаму *S. marcescens* NRRL B-23112 та подальшому очищенню ферменту з культурального супернатанту шляхом осадження сульфатом амонія, фракційного осадження ацетоном та ізоелектричного осадження отримували результати, що еквівалентні продукуванню ферменту продуцентом на мінімальному середовищі з глюкозою протягом 48 годин із подальшим додаванням 10% (мас./об.) знежиреного молока з інтервалом у 12 годин [69]. Стратегію додавання знежиреного молока або молочної сироватки як потужного індуктора протеолітичної активності використовують і для оптимізації інших середовищ. Загалом, використання молочної сироватки при приготуванні живильних середовищ, яка є побічним продуктом переробки

молока та створює великі екологічні проблеми при очищенні стічних вод молокопереробних підприємств через високе біологічне споживання кисню, є гарним прикладом сталого виробництва. Для отримання ферменту при культивуванні штаму *Serratia marcescens* ATCC 25419 використовували середовище, що містить триптон, дріжджовий екстракт, гліцин, хлорид натрію, знежирене молоко 1% (мас./об.) та 0,5% (мас./об.) глюкози, використання яких сприяло індукції ферменту [70].

Підбір умов середовища для інших штамів мікроорганізмів також базується на оптимізації. Наприклад, оптимізоване середовище для виробництва серрапептидази актиноміцетним штамом *Streptomyces hydrogenans* MGS13 містить соєвий шрот 13,5 г/л, глюкозу 13,5 г/л, гліцерин 2,44 мл/л, кальцію карбонат 0,9 г/л, триптон 15,6 г/л, калію дигідрофосфат 2,24 г/л, призвело до покращеного продукування серратіопептидази до 254,56 Од/мл [71]. Якщо в попередньому прикладі для вирощування *Streptomyces hydrogenans* використовували метод глибинної ферментації з рідким живильним середовищем, то слід зазначити, що існують розробки і з використанням твердофазної ферментації, які показують гарні співставні результати накопичення ферменту. Так, для отримання ферменту за допомогою штаму *S. hydrogenans* var. MGS13 використовували оптимізоване середовище на основі борошна кінських бобів 4,8 г та соєвих бобів 1,1 % [42].

Ще одним прикладом є оптимізоване середовище для *Bacillus licheniformis* NCIM 2042 на основі гліцерину, глюкози, триптону, оксалату амонію, ацетату натрію, гідрофосфату натрію та сульфату амонію (кожен по 10 г/л) при рН 6,5, температурі 35 °С, через 24 години, що дозволяє отримати вихід 22,85 Од/мл. До оптимізації середовища для ферментації концентрація серратіопептидази становила 16,52 Од/мл при температурі 30 °С та рН 7,0 через 48 годин [72].

Таким чином, оптимальними джерелами глюкози для більшості природних видів продуцентів серратіопептидази є глюкоза та мальтоза, а також гліцерин, джерело нітрогену – триптон.

Для рекомбінантних штамів використовують досить прості середовища. Так, для дріжджів *Pichia pastoris* – мінімальне середовище з гістидином (ММН) як ростове та мінімальне середовище з гліцерином і гістидином (МГҮН) при ферментації (вихід білка склав 0,6 мг/мл) [66]. Для штаму *E. coli* BL21 (DE3) використовували середовище наступного складу: глюкоза 16 г/л, соєвий пептон 66 г/л, калію дигідрофосфат 12,7 г/л, магнію сульфат 1,2 г/л та розчин мікроелементів 25 мл/л з виходом загального білка 2,5 г/л та активністю 8382 Од/мг [73].

3.2 Вплив фізико-хімічних параметрів на біосинтез ферменту

Ефективність ферментаційного процесу критично залежить від параметрів культивування – температури ферментації, рН, швидкості аерації, які так само як і склад середовища підбираються під кожний продуцент в результаті досліджень та оптимізації.

Вплив температури. Для більшості штамів продуцентів *Serratia spp.* оптимальний температурний режим ферментації лежить у межах 32–37 °С, для *Bacillus licheniformis* – 35 °С, для *Streptomyces hydrogenans* – 28 °С. У більшості випадків максимальна активність протеази спостерігається при 37 °С, при зниженні температури до 28 °С та 20 °С порівняльна активність становила 70 % та 61 % відповідно, а при підвищенні до 50 °С та 60 °С знижувалась до 33 % та 1 2% відповідно [42]. Вплив температури на активність ферменту підкреслює той факт, що температура середовища реакції регулює активність серратіопептидази, і для розщеплення субстрату необхідна ідеальна температура. Але, слід відмітити, що фізико-хімічні властивості серратіопептидаз, отриманих від різних продуцентів, можуть коливатись, це стосується і активності ферменту за різних температур. Наприклад, для ферментів, отриманих з продуцентів *Serratia sp.* RSPB1, *Bacillus brevis* MWB-01 та *Pseudomonas fluorescens* 114 оптимальна активність ферменту спостерігалася при 37 °С, 40 °С та 35 °С відповідно [74-76]. Деякі штами мають

певну термічну стабільність, наприклад помірно термостабільністю володіють протеази *S. hydrogenans* var. MGS13, *S. marcescens* та *Bacillus cereus* B80, які зберігали 50% своєї активності при 60 °C, 50 °C та 70 °C відповідно [42, 74, 77].

Вплив рН. Значення рН для максимального продукування серрапептази з *Serratia marcescens* становить від 5,0 до 9,0 (найкращий буфер - фосфатний буфер, оптимальне 7,3); помітне зниження продуктивності спостерігається як при вищих, так і при нижчих значеннях рН від оптимального значення рН [78]. Але сам фермент знаходиться в активній формі та є стабільним навіть при рН 9,0 [79]. Оптимальне значення рН для максимального продукування серрапептази *Bacillus licheniformis* становило 6,5 [72], *Streptomyces hydrogenans* - 6,5-7,0 [80], *Pseudomonas aeruginosa* MN1 - 8,0 [81].

Вплив перемішування та аерації. Для всіх аеробних культур аерація є важливим технологічним параметром, що впливає на продуктивність продуцента, а перемішування ще й забезпечує рівномірне розподілення живильних речовин по всьому об'єму середовища. Вибір оптимальних параметрів аерації та швидкості перемішування залежить від об'ємів виробництва і досліджується індивідуально.

Час ферментації. Численними дослідженнями показано, що оптимальний час для росту біомаси та накопичення серратіопептидази продуцентами є 24-26 год. Як приклад на рис. 3.1 показана крива росту (та ріст загального білку і активність ферменту) для штаму *Serratia marcescens* VS56.

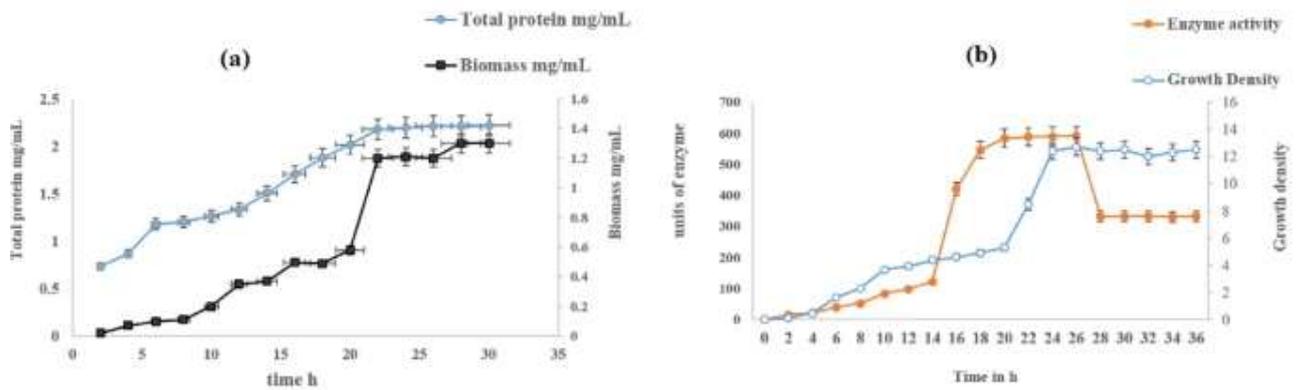


Рис. 3.1 – Крива росту *Serratia marcescens* VS56: (a) Загальний білок та біомаса *S. marcescens* VS56; (b) Активність ферментів та швидкість росту *S. marcescens* VS56 (Ілюстрація взята з [43])

3.3 Вибір методів виділення та очищення ферменту

Очищення цільового ферменту зазвичай проводиться за багатостадійною схемою, що включає методи осадження, діалізу, ультрафільтрації, у водних двофазних системах, хроматографії. Найбільш ефективним методом попереднього очищення серратіопептидази більшості штамів продуцентів визнано діаліз після попереднього осадження сульфатом амонію. Такий підхід забезпечує зростання питомої активності, наприклад у дослідженнях з *Serratia marcescens* VITSD2 з 12,00 ОД/мл до 25,7 ОД/мл [82].

Серрапептидазу також можна очистити за допомогою методу трифазного розподілу з ультразвуком, який не лише очищує, а й концентрує фермент. Цей метод має ряд переваг, зокрема одностадійність, легке масштабування та економічність; він забезпечує близько 96% виходу серрапептидази з 9,4-кратним ступенем очищення за 5 хв за оптимальних умов (30% мас./об. сульфату амонію, співвідношення бутанолу до сировини 1:1, рН 7,0, інтенсивність ультразвуку 0,05 Вт/см², частота 25 кГц) [83].

Для отримання препаратів фармацевтичного ступеня чистоти застосовують обернено-фазову ВЕРХ (RP-HPLC), яка гарантує вихід продукту

понад 99% відповідно до вимог ІСН. Рекombінантні форми ферментів очищують в один етап за допомогою афінної хроматографії.

3.4 Пропозиція технології виробництва серратіопептидази для вітчизняного підприємства

Для українського фармацевтичного або біотехнологічного підприємства пропонується впровадити технологію виробництва серратіопептидази на основі проаналізованих досліджень на основі штаму *Serratia marcescens* VS56, ізольованого з ґрунту, з оптимізацією процесу ферментації з використанням статистичних методів (OFAT та RSM), що дозволяє досягти високої продуктивності ферменту.

Впровадження цієї технології в Україні є вигідним, так як країна має розвинену фармацевтичну промисловість, доступні сировинні ресурси (наприклад, глюкозу з крохмалю кукурудзи або пшениці, екстракт яловичини з м'ясопереробних підприємств, соєві ізоляти із заводів глибокої переробки сої), а також для наукової підтримки розробки – наукові центри (наприклад, Інститут мікробіології і вірусології НАН України). Власне виробництво ферменту мікробним синтезом дозволить зменшити залежність від імпорту, знизити вартість препаратів і створити нові робочі місця, а також у перспективі буде основою для розширення продукції – інших ферментів або терапевтичних білків, які підприємство зможе виробляти. Орієнтовна вартість впровадження в першу чергу залежить від обладнання вже наявного на підприємстві та витрат на необхідне обладнання; на лабораторному рівні основне обладнання – шейкери, центрифуги, хроматограф, при масштабуванні – інокулятор та ферменер. На багатьох вітчизняних фармацевтичних підприємствах наявне обладнання для пілотного виробництва, яке може бути забезпечено лабораторним обладнанням (в BSL-2 лабораторії, біобезпека рівня 2). Виробництво серратіопептидази може бути організоване як виробництво діючої речовини in-bulk з реалізацією іншим

виробникам лікарських форм або як повний цикл готового продукту, що потребує реєстрації в МОЗ України (як дієтичної добавки або лікарського засобу).

Стадії R&D (research and development) та масштабування.

1. *Обґрунтування продуцента.* Продуцентом є *Serratia marcescens* VS56 (GenBank accession OQ859929) - грамнегативна, факультативно-анаеробна паличкоподібна бактерія, ізольована з ґрунту (відходи рибного ринку в Індії, але аналогічні штами можна ізолювати з українських ґрунтів, наприклад, з сільськогосподарських підприємств). Цей штам обрано за високу продуктивність (до 6516,4 U/mL серратіопептидази), непатогенність у тестах (відсутність гемолізу, біоплівки) і відносну термостабільність [43].

2. *Отримання штаму продуцента.* Штам продуценту можна замовити з колекцій (наприклад, ATCC або IMTECH, Індія) або ізолювати локально за методиками описаними у розділі 2.

а) *Ізоляція.* Зразки ґрунту збагачують на казеїновому агару при 30°C, де колонії утворюють зони гідролізу (діаметр 12 мм для VS56).

б) *Ідентифікація.* Дослідження морфологічних, культуральних, біохімічних, молекулярних властивостей. Морфологія *S. marcescens* VS56 – рухливі палички 0,5–0,8 × 0,9–2,0 мкм, біохімічні тести – позитивні на каталазу, негативні на оксидазу, ферментація глюкози з газом), молекулярні – 16S rRNA-секвенування (подібність >98% з *S. marcescens*).

в) *Зберігання.* У замороженому стані при -80°C під гліцериним або ліофілізовано.

г) *Активація.* Пересіяти на агар TSA при 37°C на 24 год.

3. *Обґрунтування та оптимізація живильного середовища.* Середовище повинно бути багатим на білки (як індуктори протеаз) і вуглеводи (для росту). За основу взято базове середовище, яке у дослідженням з *S. marcescens* VS56 показало найвищу активність ферменту (3981,87 ± 0,6 U/mL) з найвищою протизапальною дією (96,4% захисту еритроцитів) [43]. Склад базового середовища (1 л): казеїновий пептон – 17 г (джерело нітрогену, індуктор),

соевий пептон – 3 г (додатковий органічний нітроген), дикалію гідрофосфат (K_2HPO_4) – 2,5 г (буфер, джерело фосфору), глюкоза – 2,5 г (джерело вуглецю), хлорид натрію (NaCl) - 5 г (осмотичний баланс), рН: $7 \pm 0,2$.

У дослідженнях з підвищення виходу ферменту за прикладом багатьох наукових робіт можна застосувати оптимізацію умов ферментації, зокрема і складу середовища, з використанням статистичних методів та дизайну експерименту. Для обраного штаму після однофакторної оптимізації RSM та факторному експерименті на моделі Бокса Бенкена, що оцінювався за впливом трьох вхідних факторів (концентрація глюкози, концентрація яловичого екстракту, рН, на активність ферменту, яка є змінною відгуку) було підібрано оптимізоване середовище, що підвищує вихід на 63,65% [43]. Як джерело вуглецю із досліджуваних глюкози, лактози, декстрози, мальтози, гліцерину зупинились на глюкозі із вмістом 3 г, як джерело азоту серед досліджуваних соєвого пептону, дріжджового екстракту, яловичого екстракту обрано останній із вмістом 3 г. Глюкоза є джерелом вуглецю, що легко метаболізується клітинами, сприяє росту продуцента та виробленню серратіопептидази, яловичий екстракт, що містить високий рівень амінокислот та факторів росту, забезпечує необхідний азот та підтримує синтез ферментів. Комбіноване використання глюкози та яловичого екстракту значно збільшило як активність ферментів, так і загальний вихід білка, що підтверджувало їхню важливу функцію в максимізації вироблення серратіопептидази. Порівняно з базовим середовищем ($3981,87 \pm 0,6$ Од/мл активності ферменту) при оптимізації спостерігалось збільшення до 6516,4 од/мл. Таким чином, оптимізоване середовище має наступний склад: казеїновий пептон - 17 г, яловичий екстракт - 3 г, дикалію гідрофосфат (K_2HPO_4) – 2,5 г, глюкоза – 3 г, хлорид натрію (NaCl) - 5 г, рН: $7,5 \pm 0,1$.

Для дослідженнях на підприємстві також як фактори оптимізації середовища та зменшення його собівартості можна розглянути додавання 0,01% $ZnCl_2$ (як кофактор для металопротеази), як у подібних дослідженнях з *S. marcescens* С8, що показало збільшення продуктивності до 4501 Од/мл [84],

або заміну яловичого екстракту на горохове борошно, як у дослідженнях з *S. marcescens* MES-4 (збільшення продуктивності до 2080 Од/мл) [85].

4. Підбір та оптимізація умов ферментації

Цю стадію R&D також можна проводити у виробничій лабораторії підприємства. Починати дослідження можна із підібраних умов для модельного штаму *Serratia marcescens* VS56, за необхідністю проводячи оптимізацію умов статистичними методами.

Ферментація – глибинна, аеробна, режим – періодичний з підпиткою (додавати глюкозу порціями для уникнення репресії); з контролем температури (37 °C), рН, аерації та перемішування.

Протягом процесу потрібно проводити постійний моніторинг рН (рН-метр), так як в процесі життєдіяльності бактерії споживають субстрат і виділяють продукти метаболізму, що змінює рН. У біореакторах рН-метр автоматично подає сигнал на додавання лугу чи кислоти для підтримки заданої точки. Так як серратіопептидаза – це лужна протеаза, то вона найкраще синтезується і зберігає стабільність при рН 8,0–9,0. Для модельного продуцента початкова рН 7,5, підтримка повинна бути на рівні 7–7,5.

Для проведення ферментації в аеробних умовах важливим є моніторинг розчиненого кисню (DO-сенсор). При низькому DO (нижче 10–15%) клітини переходять на менш ефективний метаболізм, що призводить до накопичення небажаних побічних продуктів (наприклад, етанолу або лактату) і різкого зниження виходу серратіопептидази. Для проведення процесу у шейкерах (для 100–500 мл) інтенсивність перемішування потрібно підтримувати на рівні 150–240 об/хв, після масштабування у біореакторах (10–100 л) підтримувати об'ємний коефіцієнт масопередачі кисню (k_{La}) має складати 25–30 год⁻¹, при цьому подача повітря регулюється на рівні 1–2 об/об/хв, а швидкість обертання мішалки – 200–500 об/хв. При масштабуванні необхідно підтримувати умови, за яких швидкість передачі кисню перевищує швидкість його споживання (при швидкості споживання кисню мікроорганізмами на рівні 1,96 год⁻¹).

Також протягом процесу потрібно проводити моніторинг біомаси (OD_{600} оптична щільність) та активності ферменту (методи у розділі 2), що дозволяє побудувати криву росту. Для синтезу серратіопептидази важливо знати, коли культура переходить з фази активного поділу у фазу стаціонарну, оскільки саме в цей момент часто починається максимальне виділення ферменту. Дослідження модельного штаму *S. marcescens* VS56 показало, що крива росту проходить типові фази кривої росту при періодичному культивуванні - лаг-фаза 0–9 год, експоненціальна 10–18 год, стаціонарна 20–36 год (рис. 3.1), час генерації $g = 12$ хв, швидкість росту $k = 1,96$ год⁻¹; максимальне виробництво ферментів спостерігалось через 24 години з найвищою активністю на 26-й годині (активність ферменту $591 \pm 1,1$ Од/мл, біомаса $1,8 \pm 0,1$ мг/мл) % [43].

Виробничі стадії пілотної лінії містять традиційні стадії мікробного синтезу – передферментаційні (приготування середовища та інокулюму), ферментаційну (вирощування в посівному апараті та ферментері) та післяферментаційну (відділення біомаси, очищення). Масштабування до посівного апарату 10 л та ферментера 100 л з коефіцієнтом наповнення 0,6 (стандарт для уникнення переливу та забезпечення аерації) дозволяє виробляти субстанцію для промислових потреб. Втрати враховуються як 5% на стадії приготування середовища (випарювання під час стерилізації, осадження компонентів) та 5% на ферментації (випарювання, взяття проб, адгезія до стінок). Розрахунок середовища проводиться окремо для кожної стадії, з урахуванням інокуляції: 500 мл інокулюму в посівний апарат (8,3% від робочого об'єму 6 л), а культура з посівного (6 л) – в ферментер (10% від 60 л). Загальна кількість середовища: для посівного – 5,79 л (з втратами), для ферментера – 56,84 л (з втратами), всього 62,63 л на цикл.

Стадія 1. Приготування живильного середовища здійснюється у реакторі та автоклаві. Оптимізоване середовище базується на TSB, але з коригуванням для штаму VS56: глюкоза 3 г/л, екстракт яловичини 3 г/л, казеїновий пептон 17 г/л, соєвий пептон 3 г/л, NaCl 5 г/л, K_2HPO_4 2,5 г/л; рН 7,5. Зважити компоненти (точність $\pm 0,1$ г), розчинити в дистильованій воді,

перемішати магнітною мішалкою (300 об/хв, 30 хв) у реакторі з нержавіючої сталі (AISI 316L). Стерилізація автоклавуванням при 121°C, тиск 1,1 кгс/см², цикл 45 хв з охолодженням. Для посівного апарата (робочий об'єм 6 л, інокулюм 0,5 л) середовища потрібно 5,5 л; з втратами 5% – готувати 5,5 л / 0,95 = 5,79 л, для ферментера (робочий об'єм 60 л, інокулят 6 л): середовища потрібно 54 л; з втратами 5% – готувати 54 л / 0,95 = 56,84 л (57 л). Загалом: 5,8 л + 57 л = 62,8 л (сухих компонентів 1,88 кг).

Таблиця 3.1 - Контрольні точки та вихід на стадії 1 (приготування середовища)

Контрольна точка	Параметр	Значення	Вихід (об'єм середовища)	Примітки
Після розчинення	pH, осад	pH $7,5 \pm 0,2$; відсутність осаду	62,8 л (перед стерилізацією)	Візуальний контроль; корекція pH NaOH/HCl
Після стерилізації	Температура, стерильність	121°C, 1,1 кгс/см ² ; стерильність	59,66 л (після втрат 5%)	Охолодити до 37°C; втрати 3,14 л (випарювання)
Загальний вихід стадії	Об'єм готового середовища	59,66 л	Ефективність 95%; втрати 5% (3,14 л)	5,51 л для посівного, 54,15 л для ферментера

Стадія 2. Підготовка інокулюму

Для активації штаму проводять пересів з агарового середовища TSA (15 г/л казеїновий пептон, 5 г/л соєвий пептон, 5 г/л NaCl, 15 г/л агар; pH 7,3) в колби з 500 мл TSB (базове середовище). Інкують при 37°C, перемішуванні 150–200 об/об/хв, 24 год (до OD₆₀₀ 0,5–1,0, 10⁸ КУО/мл).

Таблиця 3.2 - Контрольні точки та вихід на стадії 2 (підготовка інокулюму)

Контрольна точка	Параметр	Значення	Вихід (активність, маса білка)	Примітки
Після пересіву	Чистота	Відсутність контамінації	до 100 ОД/мл	Мікроскопія; тест на пігмент (продігіозин)
Через 12 год	OD ₆₀₀ , pH	OD 0,3–0,5; pH 7,0–7,5	500–1000 ОД/мл; маса білка 1–2 г	Контроль росту

Через 24 год	OD ₆₀₀ , КУО/мл	OD 0,5–1,0; 10 ⁸ КУО/мл	Активність 1000–2000 ОД/мл; маса білка 2,5–5 г	Готовність для інокуляції; втрати до 1%
Загальний вихід стадії	Об'єм інокулюму	500 мл	Активність 1000–2000 ОД/мл; маса до 5 г	Чистота культури

Стадія 3. Ферментація

500 мл інокулюму (8,3%) в посівний апарат (з 5,51 л оптимізованого середовища). Вирощують 26 год (37°C, 240 об/хв, рН 7,5 аерація 0,5–1 об/об/хв (DO >20%), рН 7,5 (авторегуляція). Потім 6 л культури (10%) пересівають у ферментер (з 54,15 л середовища), вирощування за тими ж умовами 26 год. Моніторинг кожні 4–6 год – проби на OD600, рН, активність (азоказеїновий тест), загальний білок (метод Лоурі). Для модельного продуценту через 26 год активність має бути на рівні 6516,4 ОД/мл, білок 25,7 мг/мл.

Таблиця 3.3 - Контрольні точки та вихід на стадії 3 (ферментація)

Контрольна точка	Параметр	Значення	Вихід (активність, маса білка)	Примітки
Посівний апарат				
Початок	OD, рН	OD 0,08; рН 7,5	до 100 ОД/мл)	Інокуляція 500 мл
Через 12 год	OD, DO	OD 0,5; DO >30%	2000 ОД/мл; маса білка 6–9 г	Регуляція аерації
Через 26 год	OD, активність	OD 1,5; 6516 ОД/мл	Активність 6516 ОД/мл; маса білка 15,4 г	Втрати 5% (0,3 л)
Ферментер				
Початок	OD, рН	OD 0,15; рН 7,5	600 ОД/мл	Інокуляція 6 л
Через 12 год	OD, DO	OD 0,8; DO >20%	3000 ОД/мл; маса білка 90–120 г	Моніторинг проб
Через 26 год	OD, активність	OD 2,0; 6516 ОД/мл	Загальна активність 372312000 ОД; маса білка 1470 г (24,5 мг/мл × 60 л)	Втрати 5% (3 л)
Загальний вихід стадії	Об'єм культури	57 л (після втрат)	Активність 6516 ОД/мл; маса 1396 г	Ефективність 95%; втрати 5% (3 л)

Стадія 4. Відділення біомаси

Продуцент продукує екстрацелюлярний фермент, тому подальші роботи ведуться з культуральною рідиною від якої відділяють біомасу клітин центрифугуванням (5000 об/хв, 15 хв, 4°C) та фільтрацією (0,45 мкм).

Таблиця 3.4 - Контрольні точки та вихід на стадії 4 (відділення біомаси)

Контрольна точка	Параметр	Значення	Вихід (активність, маса білка)	Примітки
Перед центрифугуванням	Об'єм	57 л; 6516 ОД/мл	Загальна 371412000 ОД	Контроль контамінації
Після центрифугування	Об'єм супернатанту	56 л	Активність 6516 ОД/мл; маса 1365 г	Тест на осад
Після фільтрації	Чистота	Відсутність клітин; 56 л	Вихід 98%; активність 6390 ОД/мл; маса 1345 г	Стерильність
Загальний вихід стадії	Об'єм	56 л	Активність 6390 ОД/мл; маса 1345 г	Ефективність 98%

Стадія 5. Очищення ферменту

Із проведеного аналізу для виділення та очищення ферменту використовують багатоетапне очищення преципітацією, діалізом та гель-фільтрацією.

Преципітація амонієм сульфатом. Додати $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 20–80% насичення (повільно, на льоду, перемішуючи). Температура 4°C, 12 год. Центрифугування 5000 об/хв, 15 хв. Розчинення осаду в 5 л фосфатного буферу (50 мМ NaPO_4 , рН 7,0). Вихід 20,39%, специфічна активність 8320,75 ОД/мг, маса 274 г (0,52-кратне очищення).

Діаліз. Мембрана (10–12 кДа), фосфатний буфер (рН 7,0), 4°C, зміна буферу кожні 4 год. Вихід 15%, активність 12241,5 ОД/мг, маса 202 г (0,76-кратне).

Гель-фільтрація (Sephadex G-100). Колонка (1,5 × 50 см), елюція боратним буфером (50 мМ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, рН 7,0), швидкість 0,5 мл/хв. Збір фракцій

з піком активності. Вихід 7,51%, активність 30658 Од/мг, маса 101 г (95-кратне очищення), Мм 60 кДа.

Таблиця 3.5 - Контрольні точки та вихід на стадії 5 (очищення ферменту)

Контрольна точка	Параметр	Значення	Вихід (відсоток, активність, маса білка)	Примітки
Преципітація				
Після насичення	Насичення	80%; 4°C	Вихід 20,39%; активність 8320 Од/мг; маса 274 г	Контроль осаду
Після центрифугування	Об'єм	5 л	0,52-кратне очищення	Тест білка
Діаліз				
Кожні 4 год	Провідність	до 10 мСм/см	Вихід 15%; активність 12241 Од/мг; маса 202 г	Контроль солей
Після 24 год	Об'єм	4 л	0,76-кратне очищення	Тест активності
Гель фільтрація				
Завантаження	Об'єм	100 мл/партія		Детекція - UV-моніторинг
Елюція	Фракції	Пікові	Вихід 7,51%; активність 30658 Од/мг; маса 101 г	SDS-PAGE електрофорез (Мм білка 60 кДа)
Маса субстанції	1–2 л концентрату	Вихід 7,51%; активність 30658 Од/мг; маса 101 г	Ефективність 7–10%; ліофілізація	

Очищена серратіопептидаза з етапу 5 є високовартісним активним фармацевтичним інгредієнтом (АФІ) з потужними протизапальними, фібринолітичними та антибіоплівковими властивостями, зазвичай досягаючи специфічної активності близько 30658 ЕОд/мг та молекулярної маси 60 кДа. Цей напівпродукт, отриманий після гель-фільтраційної хроматографії перебуває у буферному розчині або ліофілізованому порошковому вигляді, готовому для подальшої фармацевтичної обробки. Очищений фермент (напівпродукт) після ліофілізації надалі може реалізовуватись як субстанція іншим підприємствам (готовий продукт) або направлятись в цех готових

лікарських форм. Напівпродукт можна формулювати в пероральні лікарські форми. Пероральні таблетки або капсули є найпоширенішими, враховуючи використання серратіопептидази в системній ензимотерапії. Ентеросолюбільне покриття є необхідним для захисту ферменту від шлункової кислоти (рН 1-3), де він швидко деградує; покриття, такі як кополімери метакрилової кислоти (наприклад, Eudragit L100), забезпечують вивільнення в тонкому кишечнику (рН 6-8). Типова доза 10-20 мг на таблетку, змішана з ексципієнтами, такими як мікрокристалічна целюлоза (в'язуча, 50-70% мас/мас), стеарат магнію (антиадгезив, 1-2% мас/мас) та діоксид кремнію (антизліпальний, 0,5-1% мас/мас). Етапами процесу є: волога грануляція (змішування з водою/етанолом, сушіння при 40-50°C), компресія (таблетковий прес при 10-20 кН) та покриття (апарат з киплячим шаром).

Підприємство може використовувати субстанцію для виробництва комбінованих дієтичних добавок, як у дієтичних добавках, описаних в розділі 1, що можуть включати астаксантин (для антиоксидантної синергії) або бромелаїн (для посиленого протеолізу). Залежно від можливостей підприємства можливе впровадження ліпосомальної інкапсуляції (наприклад, з використанням фосфатидилхоліну), що покращує біодоступність у 2-3 рази, або виробництво гелів для топічного застосування (наприклад, загоєння ран).

Обов'язковим етапом після формулювання є контроль якості готового продукту (залежно від лікарської форми). До ключових аналізів відносяться:

- активність ферменту. Метод азоказеїну (1 О = гідроліз 1 мкг тирозину/хв при 37°C, рН 9), з цільовим >20000 Од/10 мг дози.

- чистота. ВЕРХ (час утримання 4,66 хв) або SDS-PAGE (єдина смуга на 60 кДа).

- стабільність. Прискорені тести (40°C/75% вологість, 6 місяців) та реального часу (25°C/60% вологість, 24 місяці); ліофілізація (заморожування-сушіння при -50°C, вакуум 0,1 мбар) подовжує термін придатності до 3 років з втратами <10%.

- мікробіологічна безпека. Тести на стерильність, рівень ендотоксинів (за допомогою LAL-аналізу).

Висновок до 3 розділу

Оптимізація складів живильних середовищ є критичним етапом для підвищення виходу серратіопептидази. Традиційні середовища, такі як триптиказеїно-соєвий бульйон (TSB), збагачені білковими компонентами (казеїн, пептон, триптон, желатин, знежирене молоко), ефективно індують синтез протеаз, забезпечуючи високу продуктивність штамів *Serratia marcescens*. Застосування статистичних методів, таких як OFAT та RSM з дизайном Бох-Бейнкен, дозволяє досягти зростання виходу цільового продукту шляхом підбору джерел вуглецю (глюкоза, мальтоза) та азоту (триптон, соєве борошно). Використання побічних продуктів (молочна сироватка, борошно кінських бобів) сприяє сталому виробництву, зменшуючи екологічне навантаження та витрати.

Вплив фізико-хімічних параметрів на біосинтез ферменту визначає оптимальні умови культивування. Методи виділення та очищення ферменту базуються на багатостадійних схемах, що забезпечують високий ступінь чистоти.

Пропозиція технології виробництва для вітчизняного підприємства, розроблена на основі аналізу сучасних наукових джерел, на основі штаму *Serratia marcescens* VS56, забезпечує повний цикл від R&D до промислового випуску (пілотної серії), з використанням доступних ресурсів (глюкоза, екстракт яловичини). Стадії включають підготовку інокулюму, ферментацію (глибинна, 37 °C, рН 7,5, 26 год), відділення біомаси (центрифугування, фільтрація) та очищення (преципітація, діаліз, хроматографія), з виходом 101 г очищеного ферменту на цикл (60 л). Актуальність для України полягає в зменшенні імпорту, економії та створенні робочих місць, з можливістю реєстрації як АФІ для таблеток чи добавок. Масштабування до 100 л з ефективністю 95% робить технологію рентабельною для виробника.

ВИСНОВКИ

У кваліфікаційній роботі проведено комплексний аналіз сучасних біотехнологій виробництва серратіопептидази та розроблено рекомендації щодо можливості їхньої реалізації на вітчизняних підприємствах. За результатами проведених досліджень зроблено такі висновки:

1. Встановлено, що світовий ринок серратіопептидази стрімко розвивається (прогнозований обсяг до 540 млн дол. США до 2032 року) завдяки широкому спектру її терапевтичних властивостей. В Україні попит на препарати серратіопептидази є високим, проте ринок представлений імпортною субстанцією, що підкреслює актуальність створення власного виробництва.

2. Проведено аналіз наявних на ринку лікарських засобів та дієтичних добавок. Виявлено, що найбільш поширеними є імпортні препарати у вигляді пероральних форм (таблетки та капсули) з дозуванням 10 мг та 20 мг, які використовуються як протизапальні, протинабрякові та фібринолітичні засоби.

3. У ході порівняльного аналізу різних мікроорганізмів (бактерій роду *Serratia* та інших родів, рекомбінантних штамів *E. coli*, *P. pastoris*) обрано перспективний для промислового впровадження непатогенний, високоврожайний штам *Serratia marcescens* VS56. Він характеризується високою ферментативною активністю (до 6516 ОД/мл) та виходом білка та відносною термостабільністю.

4. Обґрунтовано, що оптимальною технологією є мікробний синтез із застосуванням стратегій оптимізації поживних середовищ (методи OFAT та RSM). Встановлено оптимальні умови культивування: температура 37°C, рН 7,5 та тривалість ферментації 24–26 годин.

5. На основі проведеного аналізу розроблено технологічну схему виробництва субстанції серратіопептидази для вітчизняного підприємства. Схема включає стадії підготовки середовища, ферментації, виділення

ферменту методом центрифугування та багатоетапного очищення (преципітація сульфатом амонію, діаліз, гель-фільтрація), що дозволяє отримати продукт фармацевтичної чистоти з високою питомою активністю.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Serratiopeptidase: An integrated View of Multifaceted Therapeutic Enzyme / S. R. Nair et al. *Biomolecules*. 2022. Vol. 12, № 10. P. 1468. URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9599151/> (Date of access: 10.12.2025).
2. Pahwa R., Goyal A., Jialal I. Chronic Inflammation. *StatPearls*. Treasure Island : StatPearls Publishing, 2025. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493173/> (Date of access: 10.12.2025).
3. Serratiopeptidase Market Report. *Dataintel*. 2025. URL: <https://dataintel.com/report/global-serratiopeptidase-market> (Date of access: 07.12.2025).
4. De Duve C. The significance of lysosomes in pathology and medicine. *Proc. Inst. Med. Chic.* 1966. Vol. 26. P. 73–76.
5. Enzyme Therapy: Current Challenges and Future Perspectives / M. de la Fuente, et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22, № 17. P. 9181. DOI: 10.3390/ijms22179181.
6. Belachew G. T. Enzymes for Disease Treatment: A Review. *Biomedical Journal of Scientific and Technical Report*. 2023. Vol. 49, № 3. P. 40710–40717. DOI: 10.26717/BJSTR.2023.49.007809.
7. Kumar S. S., Abdulhammed S. Therapeutic enzymes. *Bioresources and Bioprocess in Biotechnology* / ed. by S. Sugathan, N. S. Pradeep, S. Abdulhammed. Singapore : Springer Singapore, 2017. P. 45–73.
8. Serratiopeptidase. URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Serratiopeptidase> (Date of access: 10.12.2025).
9. Ethiraj S., Gopinath S. Production, purification, characterization, immobilization, and application of Serrapeptase: a review. *Frontiers of Biology in China*. 2017. Vol. 12, № 5. P. 333–348. DOI: 10.1007/s11515-017-1461-3.

10. Tiwari M. The role of serratiopeptidase in the resolution of inflammation. *Asian J. Pharm. Sci.* 2017. Vol. 12. P. 209–215. DOI: 10.1016/j.ajps.2017.01.003.
11. Serratiopeptidase: Insights into the therapeutic applications / S. B. Jadhav et al. *Biotechnol. Rep.* 2020. Vol. 28. P. e00544. DOI: 10.1016/j.btre.2020.e00544.
12. Viswanatha Swamy A. H. M., Patil P. A. Effect of some clinically used proteolytic enzymes on inflammation in rats. *Indian J. Pharm. Sci.* 2008. Vol. 70. P. 114–117. DOI: 10.4103/0250-474X.40347.
13. Comparison of anti-inflammatory activity of serratiopeptidase and diclofenac in albino rats / S. P. Jadav et al. *J. Pharmacol. Pharmacother.* 2010. Vol. 1, № 2. P. 116–117. DOI: 10.4103/0976-500X.72362.
14. Rajinikanth B., Venkatachalam V. V., Manavalan R. Investigations on the potential of serratiopeptidase – a proteolytic enzyme, on acetic acid induced ulcerative colitis in mice. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2014. Vol. 6, № 5. P. 525–531.
15. Ateia Y. A., Al-Edanni M. S. H., Al-Qurtas M. I. Impact of metformin and serratiopeptidase in obese patients with knee osteoarthritis. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2018. Vol. 10, № 2. P. 37–41.
16. Mikhael E. M., Mohammed M. Y. Serratiopeptidase a hope in a rapid and better improvement of inflammatory acne vulgaris. *Iraqi. J. Pharm. Sci.* 2012. Vol. 21, № 1. P. 78–81.
17. Murugesan K., Sreekumar K., Sabapathy B. Comparison of the roles of Serration peptidase and dexamethasone in the control of inflammation and trismus following impacted third molar surgery. *Indian J. Dent. Res.* 2012. Vol. 23. P. 709–713. DOI: 10.4103/0970-9290.111243.
18. Zhao A., Sun J., Liu Y. Understanding bacterial biofilms: From definition to treatment strategies. *Front. Cell. Infect. Microbiol. Sec. Biofilms.* 2023. Vol. 13. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1137947.

19. Selan L., Artini M., Papa R. Compounds from natural sources for new diagnostics and drugs against biofilm infections. *Microbial Biofilms: Importance and Applications* / ed by D. Dhanasekaran, N. Thajuddin. London : Intechopen, 2016. P. 487–509.
20. Protease treatment affects both invasion ability and biofilm formation in *Listeria monocytogenes* / C. Longhi et al. *Microb. Pathog.* 2008. Vol. 45, № 1. P. 45–52. DOI: 10.1016/j.micpath.2008.01.007.
21. Comparison of the action of different proteases on virulence properties related to the staphylococcal surface / M. Artini et al. *J. Appl. Microbiol.* 2013. Vol. 114, № 1. P. 266–277. DOI: 10.1111/jam.12038.
22. Serratiopeptidase: a well-known metalloprotease with a new non-proteolytic activity against *S. aureus* biofilm / L. Selan et al. *BMC microbiol.* 2015. Vol. 15, № 1. P. 207. DOI: 10.1186/s12866-015-0548-8.
23. Serratiopeptidase reduces the invasion of osteoblasts by *Staphylococcus aureus* / L. Selan et al. *Int. J. Immunopath. Pharm.* 2017. Vol. 30, № 4. P. 423–428. DOI: 10.1177/0394632017745762.
24. Pulmonary delivery of synergistic combination of fluoroquinolone antibiotic complemented with proteolytic enzyme: a novel antimicrobial and antibiofilm strategy / P. V. Gupta et al. *Nanomedicine.* 2017. Vol. 13, № 7. P. 2371–2384. DOI: 10.1016/j.nano.2017.06.011.
25. The effect of proteolytic enzyme serratiopeptidase in the treatment of experimental implant-related infection / M. Mecikoglu et al. *J. Bone Joint Surg. Am.* 2006. Vol. 88, № 6. P. 1208–1214. DOI: 10.2106/JBJS.E.00007.
26. Clinical, microbiological and inflammatory evidence of the efficacy of combination therapy including serratiopeptidase in the treatment of periimplantitis / C. Passariello et al. *Eur. J. Inflam.* 2012. Vol. 10, № 3. P. 463–472.
27. Combination therapy including serratiopeptidase improves outcomes of mechanical-antibiotic treatment of periimplantitis / G. Sannino et al. *Int. J.*

- Immunopathol. Pharmacol.* 2013. Vol. 26, № 3. P. 825–831. DOI: 10.1177/039463201302600332.
28. Potential use of targeted enzymatic agents in the treatment of *Staphylococcus aureus* biofilm-related infections / S. Hogan et al. *J. Hosp. Infect.* 2017. Vol. 96, № 2. P. 177–182. DOI: 10.1016/j.jhin.2017.02.008.
29. Teller P., White T. K. The Physiology of Wound Healing: Injury Through Maturation. *Perioper. Nurs. Clin.* 2011. Vol. 6, № 2. P. 159–170. DOI: 10.1016/j.cpen.2011.04.001.
30. Bartold M., Ivanovski S. Biological processes and factors involved in soft and hard tissue healing. *Periodontol.* 2000. 2025. Vol. 97, № 1. P. 16–42. DOI: 10.1111/prd.12546.
31. Kaur H., Singh A. Design, development and characterization of serratiopeptidase loaded albumin nanoparticles. *J. App. Pharm. Sci.* 2015. Vol. 5, № 2. P. 103–109.
32. Clove oil emulsified buccal patch of serratiopeptidase for controlled release in toothache / P. K. Shende et al. *J. Bioequiv.* 2016. Vol. 8. P. 134–139.
33. Mali N., Wavikar P., Vavia P. Serratiopeptidase loaded chitosan nanoparticles by polyelectrolyte complexation: in vitro and in vivo evaluation. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 2015. Vol. 16, № 1. P. 59–66. DOI: 10.1208/s12249-014-0201-0.
34. Formulation and evaluation of serratiopeptidase microspheres using eudragit rs100 polymer / N. N. Hire et al. *World J. Pharm. Res.* 2014. Vol. 3, № 2. P. 3207–3218.
35. Modulation of serratiopeptidase transdermal patch by lipid-based transfersomes / P. K. Shende et al. *J. Adhes. Sci. Technol.* 2015. Vol. 29, № 23. P. 2622–2633.
36. Shinde U. A., Kanojiya S. S. Serratiopeptidase niosomal gel with potential in topical delivery. *J. Pharm.* 2014. P. 1–10. DOI: 10.1155/2014/382959.
37. Rath G., Johal E. S., Goyal A. K. Development of serratiopeptidase and metronidazole based alginate microspheres for wound healing. *Artif. Cells*

- Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 2011. Vol. 39, № 1. P. 44–50. DOI: 10.3109/10731199.2010.494580.
38. Preparation, characterization and targeted delivery of serratiopeptidase immobilized on amino-functionalized magnetic nanoparticles / S. Kumar et al. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2013. Vol. 85. P. 413–426. DOI: 10.1016/j.ejpb.2013.06.019.
39. Singh D., Singh M. R. Development of antibiotic and debriding enzyme-loaded PLGA microspheres entrapped in PVA-gelatin hydrogel for complete wound management. *Artif. Cell. Blood Sub. Biotechnol.* 2012. Vol. 40, № 5. P. 345–353. DOI: 10.3109/10731199.2012.675337.
40. Nirale N. M., Menon M. D. Topical formulations of serratiopeptidase: development and pharmacodynamic evaluation. *Indian J. Pharm. Sci.* 2010. Vol. 72, № 1. P. 65–71. DOI: 10.4103/0250-474X.62246.
41. Rani A. P., Uppala A. Enteric dispersion of serratiopeptidase with eudragit L100 and formulation of controlled release tablets of serratiopeptidase. *Int. J. Pharm. Tech. Res.* 2019. Vol. 12, № 2. P. 139–144.
42. Nageswara S., Guntuku G., Yakkali B. L. Purification, characterization, and structural elucidation of serralysin-like alkaline metalloprotease from a novel source. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 2019. Vol. 17, № 1. DOI: 10.1186/s43141-019-0002-7.
43. Nair S. R., Devi C. S. Statistical optimization of process variables for enhanced serratiopeptidase production from soil *Serratia marcescens* VS56. *Scientific Reports.* 2025. Vol. 15. DOI: 10.1038/s41598-025-13137-6.
44. Structure of a thermo stable serralysin from *Serratia* sp. FS14 at 1.1 Å resolution / D. Wu et al. *Acta Cryst.* 2016. Vol. 72. P. 10–15. DOI: 10.1107/S2053230X15023092.
45. Massaoud M. K., Marokhazi J., Venekei I. Enzymatic characterization of a serralysin-like metalloproteases from the entomopathogen bacterium, *Xenorhabdus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011. Vol. 1814. P. 1333–1339. DOI: 10.1016/j.bbapap.2011.05.008.

46. Extracellular novel metalloprotease from *Xenorhabdus indica* and its potential as an insecticidal agent / K. Pranaw et al. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2013. Vol. 23. P. 1536–1543. DOI: 10.4014/jmb.1306.06062.
47. Basu B., Apte S. K. A novel serralyisin metalloprotease from *Deinococcus radiodurans*. *Biochem. Biophys. Acta.* 2008. Vol. 1784, № 9. P. 1256–1264. DOI: 10.1016/j.bbapap.2008.05.009.
48. Kyostio S. R., Cramer C. L., Lacy G. H. *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* extracellular protease; characterization and nucleotide sequences of the gene. *J. Bacteriol.* 1991. Vol. 173. P. 6537–6546. DOI: 10.1128/jb.173.20.6537-6546.1991.
49. Continuous Fermentation of a Prodigiosin-Producing *Serratia marcescens* Strain Isolated from Soil / Qi Fu et al. *Advances in Bioscience and Biotechnology.* 2019. Vol. 10, № 4. DOI: 10.4236/abb.2019.104007.
50. Kumar S., Bhattacharya S. Optimization of Serratiopeptidase Production from *Serratia marcescens* SP6 Using Sequential Strategy of Experimental Designs. *Curr. Microbiol.* 2025. Vol. 82. P. 371.
51. Kulkova I., Wróbel B., Dobrzyński J. *Serratia* spp. as plant growth-promoting bacteria alleviating salinity, drought, and nutrient imbalance stresses. *Front. Microbiol.* 2024. Vol. 15. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1342331.
52. Nair S. R., Subathra Devi C. Bioprospecting of serratiopeptidase-producing bacteria from different sources. *Front. Microbiol.* 2024. Vol. 15. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1382816.
53. Anil C. S., Kashinath M. A. Production, characterization optimization of potent protease (serratiopeptidase) from *Serratia marcescens* e 15. *Int. Res. J. Pharm. Appl. Sci.* 2013. Vol. 3. P. 95–98. DOI: 10.1007/s11515-017-1461-3.
54. Isolation and screening of chitinase producing *Serratia marcescens* from soil / L. J. Rebecca et al. *Chem. Pharm. Res.* 2013. Vol. 5. P. 192–195.
55. Development and validation of a new chromatographic method for the simultaneous estimation of Serratiopeptidase, Aceclofenac and paracetamol

- by RP-HPLC / U. Navneet Kumar et al. *Pharm. Anal. Chem.* 2017. Vol. 3. P. 122. DOI: 10.4172/2471-2698.1000122.
56. Veggalam S., Kandi V. *Serratia marcescens* as an Uncommon Cause of Infection Following Craniectomy: A Case Report and Literature Review. *Cureus*. 2025. Vol. 17, № 6. P. e86673. DOI:10.7759/cureus.86673.
57. Virulence of entomopathogenic bacteria *Serratia marcescens* against the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) / B. Zhong et al. *PeerJ*. 2023. Vol. 11. P. e16528. DOI: 10.7717/peerj.16528.
58. *Serratia marcescens*: A Versatile Opportunistic Pathogen with Emerging Clinical and Biotechnological Significance / L. Boldeanu et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2025. Vol. 26, № 23. DOI: 10.3390/ijms262311479.
59. Peekate L., Ogolo J. The potential of *Serratia marcescens* in Bioremediation of Crude-oil Polluted Soil. *UMYU J. Microbiol. Res.* 2024. Vol. 9. P. 75–83.
60. Prodigiosin: Unveiling the crimson wonder – A comprehensive journey from diverse bioactivity to synthesis and yield enhancement / Y. Lu et al. *Front. Microbiol.* 2024. Vol. 15. P. 1412776.
61. Cloning and sequencing of *Serratia* protease gene / K. Nakahama et al. *Nucleic Acids Res.* 1986. Vol. 14, № 14. P. 5843–5855.
62. Ethiraj S., Gopinath S. Production, purification, characterization, immobilization, and application of Serrapeptase: a review. *Front. Biol.* 2017. Vol. 12, № 5. P. 333–348. DOI: 10.1007/s11515-017-1461-3.
63. Cloning, expression, and purification of insecticidal protein Pr596 from locust pathogen *Serratia marcescens* HR-3 / K. Tao et al. *Curr. Microbiol.* 2007. Vol. 55, № 3. P. 228–233.
64. Létoffé S., Delepelaire P., Wandersman C. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Serratia marcescens* metalloprotease gene: secretion of the protease from *E. coli* in the presence of the *Erwinia chrysanthemi* protease secretion functions. *J. Bacteriol.* 1991. Vol. 173, № 7. P. 2160–2166.

65. Kaviyarasi N. S., Sarkar S., Suryanarayan V. V. S. Characterization of a Gene Encoding Serrapeptidase from *Serratiamarcescens* Strain (SRM) MTCC 8708, a Plant Isolate. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 2015. Vol. 4, № 8. P. 206–214.
66. Kaviyarasi N. S., Suryanarayan V. V. S. Serrapeptidase gene of *Serratia marcescens* from plant origin expressed by *Pichia pastoris* has protease activity. *Indian Journal of Medical Research and Pharmaceutical Sciences.* 2016. Vol. 3, № 6. P. 2349–5340.
67. Medium optimization studies for Serratiopeptidase production from *Serratia marcescens* ATCC 13880 / R. V. Badhe et al. *Hindustan Antibiotics Bulletin.* 2009. Vol. 51, № 1-4. P. 17–23.
68. Pansuriya R. C., Singhal R. S. Evolutionary operation (EVOP) to optimize whey independent serratiopeptidase production from *Serratia marcescens* NRRL B-23112. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2010. Vol. 20, № 5. P. 950–957.
69. Salamone P. R., Wodzinski R. J. Production, purification and characterization of a 50-kDa extracellular metalloprotease from *Serratia marcescens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1997. Vol. 48, № 3. P. 317–324.
70. Production, purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grown in whey / F. J. Romero et al. *Process Biochem.* 2001. Vol. 36, № 6. P. 507–515.
71. Application of response surface methodology in medium components optimization to enhance serratiopeptidase production by *Streptomyces hydrogenans* MGS13 / J. Vanama et al. *European Scientific Journal.* 2014. Vol. 10, № 12. URL: <https://eujournal.org/index.php/esj/article/view/3172> (Date of access: 25.11.2025).
72. Wagdarikar J. M., Joshi A. M., Shaikh A. A. Media Optimization Studies for Enhanced Production of Serratiopeptidase from *Bacillus Licheniformis* (NCIM 2042). *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences.* 2015. Vol. 5, № 42. P. 19–23.
73. Enhanced Production Process of Recombinant Mature Serratiopeptidase in *Escherichia coli* Using Fed-Batch Culture by Self-Proteolytic Activity of

- Fusion Protein / Pooja Doshi et al. *Fermentation*. 2022. Vol. 8, № 7. DOI: 10.3390/fermentation8070307.
74. Bhargavi P. L., Prakasham R. S. A fibrinolytic, alkaline and thermo stable metalloprotease from the newly isolated *Serratia* sp. RSPB11. *Int. J. Biol. Macromol.* 2013. Vol. 61. P. 479–486. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.07.009.
75. Olajuyigbe F. M., Faladel M. A. Purification and partial characterization of serine alkaline metalloprotease from *Bacillus brevis* MWB- 01. *Bioresour. Bioprocess.* 2014. Vol. 1. P. 8. DOI: 10.1186/s40643-014-0008-6.
76. Characterization of a protease from a psychrotroph, *Pseudomonas fluorescens* 114 / T. Hamamoto et al. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994. Vol. 60. P. 3878–3880.
77. Rajasree S., Rajani S. MALDI-TOF MS and CD spectral analysis for identification and structural prediction of a purified, novel, organic solvent stable, fibrinolytic metalloprotease from *Bacillus cereus* B80. *Bio. Med. Res. Int.* 2015. Vol. 2015. P. 527015. DOI: 10.1155/2015/527015.
78. Mohankumar A., Raj R. H. K. Production and characterization of Serratiopeptidase enzyme from *Serratia marcescens*. *Int. J. Biol.* 2011. Vol. 3, № 3. P. 39–44.
79. Purification and Characterization of 50 kDa Extracellular Metalloprotease from *Serratia* sp. ZF03 / N. Salarizadeh et al. *Iranian J. Biotechnol.* 2014. Vol. 12, № 3. P. 18–27.
80. Nageswara S., Singam R., Guntuku G. Design of a low cost fermentation medium for the production of Serratiopeptidase enzyme by a novel *Streptomyces* sp. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* 2016. Vol. 5, № 10. P. 829–842.
81. Purification and characterization of an alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* MN1 / A. Bayoudh et al. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 2000. Vol. 24, № 4. P. 291–295. DOI: 10.1038/sj.jim.2900822.

82. Screening and molecular characterization of *Serratia marcescens* VITSD2: A strain producing optimum serratiopeptidase / C. S. Devi et al. *Front. Biol.* 2013. Vol. 8, № 6. P. 632–639.
83. Pakhale S. V., Bhagwat S. S. Purification of serratiopeptidase from *Serratiamarcescens* NRRL B 23112 using ultrasound assisted three phase partitioning. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2016. Vol. 31. P. 532–538.
84. Scale-Up of the Fermentation Process for the Production and Purification of Serratiopeptidase Using Silkworm Pupae as a Substrate / J. J. Melchor-Moncada et al. *Methods Protoc.* 2024. Vol. 7, № 2. P. 19. DOI: 10.3390/mps7020019.
85. Purification, functional characterization and enhanced production of serratiopeptidase from *Serratia marcescens* MES-4: An endophyte isolated from *Morus rubra* / D. Koul et al. *Journal of Biotechnology*. 2024. Vol. 387. P. 58–68.

ДОДАТКИ



Міністерство
охорони здоров'я
України

Національний
фармацевтичний
університет



СЕРТИФІКАТ

Цим засвідчується, що

Степаненко В.Д.

Науковий керівник:
Калюжная О.С.

брав(ла) участь у роботі VI Всеукраїнської
науково-практичної конференції
з міжнародною участю

**YOUTH
PHARMACY
SCIENCE**

Ректор НФаУ,
д. фарм. н., проф.



Олександр КУХТЕНКО

10-11 грудня 2025 р.
м. Харків
Україна