

BIOTECHNOLOGY

VOL. 1, N4, 2008

BIMONTHLY

Редакційна колегія

Комісаренко Сергій Васильович
(головний редактор)
Стойка Ростислав Степанович
(заст. головного редактора)
Колибо Денис Володимирович
(заст. головного редактора)
Ковтун Ірина Володимирівна
(відповідальний секретар)
Волков Георгій Леонідович
Гончар Михайло Васильович
Дзядевич Сергій Вікторович
Дробот Людмила Борисівна
Карпов Олександр Вікторович
Кунах Віктор Анатолійович
Левицький Євген Леонідович
Лукаш Любов Леонідівна
Мельничук Максим Дмитрович
Мінченко Олександр Григорович
Стародуб Микола Федорович
Товкач Федір Іванович
Філоненко Валерій Вікторович

Редакційна рада

Комісаренко Сергій Васильович
(голова)
Блюм Ярослав Борисович
Єгоров Олексій Михайлович (Росія)
Єльська Ганна Валентинівна
Кордюм Віталій Арнольдович
Кухар Валерій Павлович
Мірошников Анатолій Іванович (Росія)
Пастернак Чарльз (Великобританія)
Підгорський Валентин Степанович
Северин Євген Сергійович (Росія)
Сибірний Андрій Андрійович
Сидоров Володимир Анатолійович
(США)
Скрябін Костянтин Георгійович (Росія)
Созінов Олексій Олексійович
Широбоков Володимир Павлович

Адреса редакції:

Редакція журналу «Біотехнологія», вул. Леонтовича, 9, 01601, Київ, Україна
Телефон: (8-044) 235-14-72; E-mail: Levitsky@biochem.kiev.ua

*Свідоцтво про державну реєстрацію друкованого засобу масової інформації
серія КВ №10391 від 14.09.05*

Науковий редактор Є.Л. Левицький
Літературний редактор Г.М. Шевченко

Комп'ютерний набір Л. П. Бабенко
Комп'ютерна верстка О.В. Мележик

Підписано до друку 24.04.2009. Формат 210×297. Папір крейд. 115 г/м².
Гарн. SchoolBookC. Друк — офсетний. Обл.-вид. арк. 14,0. Наклад 350 прим.
Замовлення 4/6.

Оригінал-макет підготовлено в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України;
друк — СПД Москаленко О.М., Київ, вул. Щорса, 31, к. 8,
тел.: (8-044) 228-23-13, (8-066) 716-55-44.

БІОТЕХНОЛОГІЯ

Науковий журнал

Виходить один раз на два місяці

БИОТЕХНОЛОГИЯ / BIOTECHNOLOGY

Том 1, №4, 2008

ОГЛЯДИ

- Жерносєков Д. Д.* Протеїн С: механізми функціонування
Куркіна Т. В. та методи одержання9
- Ларченко К. А.* Біоетанол як альтернативне поновлюване
Моргун Б. В. джерело енергії18
- Пирог Т. П.* Мікробні поверхнево-активні речовини: проблеми
Ігнатенко С. В. промислового виробництва29
- Петренко О. Ю.* Стовбурові клітини із жирової тканини39
Іванов Е. М.
Петренко Ю. О.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ СТАТТІ

- Мінченко Д. О.*
Бобарикіна А. Ю.
Ратушна О. О. Домінант-негативні конструкції
Маруніч Р. Ю. 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-3
Тсучігара К. та -4 людини: вплив на експресію ендогенних мРНК
Моне М. 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатаз49
Каро Х.
Есумі Г.
Мінченко О. Г.
- Кунах В. А.*
Можилевська Л. П. Мікроклональне розмноження унгернії Віктора
Бублик О. М. (*Ungernia victoris* Vved. ex Artjushenko)57
Колоніна І. В.
Музика В. І.

<i>Капрельянц Л. В.</i> <i>Шпирко Т. В.</i> <i>Помазанова О. Ф.</i>	Модифікація пшеничного крохмалю різними амілазами64
<i>Задорожня А. М.</i> <i>Грузіна Т. Г.</i> <i>Дибкова С. М.</i> <i>Ульберг З. Р.</i>	Біоломінесцентні бактерії як сенсорні елементи для визначення вмісту іонів важких металів69
НОВІ МЕТОДИ		
<i>Пешкова В. М.</i> <i>Саяпіна О. Я.</i> <i>Солдаткін О. О.</i> <i>Кукла О. Л.</i> <i>Дзядевич С. В.</i>	Ферментний кондуктометричний біосенсор для визначення лактози76
<i>Гончар Т. М.</i> <i>Кшемінська Г. П.</i> <i>Пацай І. О.</i> <i>Гута О. М.</i> <i>Гончар М. В.</i>	Визначення вмісту хрому(III) у дріжджових культурах за допомогою хромазурулу S та поверхнево-активних речовин для скринінгу процесів біоремедіації хромату85
СТОРІНКИ ІСТОРІЇ		
<i>Виноградова Р. П.</i> <i>Колодзейська М. В.</i>	Олександр Соломонович Циперович — один із фундаторів біоіндустрії ферментів в Україні95
НОВИНИ105
НОВІ ПУБЛІКАЦІЇ З БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА СУМІЖНИХ ДИСЦИПЛІН		
КОНФЕРЕНЦІЇ, З'ЇЗДИ, СИМПОЗІУМИ, ВИСТАВКИ122

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

- Жерносеков Д. Д.* Протеин С: механизмы функционирования
Куркина Т. В. и методы получения9
- Ларченко Е. А.* Биоэтанол как альтернативный
Моргун Б. В. возобновляемый источник энергии18
- Пирог Т. П.* Микробные поверхностно-активные вещества:
Игнатенко С. В. проблемы промышленного производства29
- Петренко А. Ю.*
Иванов Э. Н. Стволовые клетки из жировой ткани39
Петренко Ю. А.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Минченко Д. А.*
Бобарыкина А. Ю.
Ратушна О. А.
Марунич Р. Ю. Доминант-негативные конструкции
Тсучигара К. 6-фосфофрукто-2-киназы/фруктозо-2,6-бисфосфатазы-3
Моне М. и -4 человека: влияние на экспрессию эндогенных мРНК
Каро Х. 6-фосфофрукто-2-киназы/фруктозо-2,6-бисфосфатаз ... 49
Есуми Г.
Минченко А. Г.
- Кунах В. А.*
Можилевская Л. П. Микроклональное размножение унгернии Виктора
Бублик Е. Н. (*Ungernia victoris* Vved. ex Artjuschenko)57
Колонина И. В.
Музыка В. И.
- Капрельяни Л. В.* Модификация пшеничного крахмала
Шпырко Т. В. различными амилазами64
Помазанова Е. Ф.
- Задорожная А. М.* Билюминесцентные бактерии как сенсорные элементы
Грузина Т. Г. для определения содержания ионов
Дыбкова С. Н. тяжелых металлов69
Ульберг З. Р.

НОВЫЕ МЕТОДЫ

- Пешкова В. Н.*
Саяпина О. Я.
Солдаткин А. А.
Кукла О. Л.
Дзядевич С. В.
- Ферментный кондуктометрический биосенсор
для определения лактозы76
- Гончар Т. М.*
Кшеминская Г. П.
Пацай И. О.
Гута А. М.
Гончар М. В.
- Определение содержания хрома (III) в дрожжевых
культурах с помощью хромазуrola S и поверхностно-
активных соединений для скрининга процессов
биоремедиации хромата85

СТРАНИЦЫ ИСТОРИИ

- Виноградова Р. П.* Александр Соломонович Циперович — один из
Колодзейская М. В. основателей биоиндустрии ферментов в Украине95

НОВОСТИ105

**НОВЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО БИОТЕХНОЛОГИИ
И СМЕЖНЫМ ДИСЦИПЛИНАМ**114

КОНФЕРЕНЦИИ, СЪЕЗДЫ, СИМПОЗИУМЫ, ВЫСТАВКИ122

CONTENTS

REVIEWS

- Zhernosekov D. D.* Protein C: mechanisms of functioning
Kurkina T. V. and production methods9
- Larchenko K. A.* Bioethanol as alternative renewable source of energy18
Morgun B. V.
- Pirog T. P.* Microbial surface-active substances:
Ignatenko S. V. problems of commercial production29
- Petrenko O. Y.* Stem cells of adipose tissue39
Ivanov E. M.
Petrenko Y. O.

EXPERIMENTAL ARTICLES

- Minchenko D. O.*
Bobarykina A. Y.
Ratushna O. O. Dominant-negative constructs of human
Marunych R. Y. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3
Tsuchihara K. and -4: effect on the expression of endogenous
Moenner M. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase
Caro J. mRNA49
Esumi H.
Minchenko O. H.
- Kunakh V. A.*
Mozhylevska L. P. Microclonal propagation
Bublyk O. M. of *Ungernia victoris* Vved. ex Artjuschenko57
Kolonina I. V.
Muzyka V. I.
- Kaprelyants L. V.*
Shpirko T. V. Modification of wheat starch by different amylases64
Pomazanova O. F.
- Zadorozhnyaya A. M.*
Gruzina T. G. Bioluminescent bacteria as sensor elements
Dibkova S. M. for the heavy metals ions' content detection69
Ulberg Z. R.

NEW METHODS

- Pyeshkova V. M.*
Saiapina O. Y.
Soldatkin O. O.
Kukla O. L.
Dzyadevych S. V.
- Enzyme conductometric biosensor
for lactose content determination76
- Honchar T. M.*
Ksheminska H. P.
Patsay I. O.
Huta O. M.
Gonchar M. V.
- Quantitative assay of chromium (III) in yeast cultures
using chromazurol S and surfactants
for monitoring chromate remediation processes85

PAGES OF HISTORY

- Vinogradova R. P.*
Kolodzewska M. V.
- Alexander Solomonovitch Tseperovitch is one of initiator
of enzyme bioindustry in Ukraine95

NEWS105

NEW PUBLICATIONS ON BIOTECHNOLOGY
AND ADJOINING BRANCHES OF SCIENCE114

CONFERENCES, CONGRESSES, SYMPOSIA, EXHIBITIONS122

ПРОТЕЇН С: МЕХАНІЗМИ ФУНКЦІОНУВАННЯ ТА МЕТОДИ ОДЕРЖАННЯ

Д. Д. ЖЕРНОСЕКОВ¹, Т. В. КУРКІНА^{1,2}

¹ Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ

² Київський національний університет імені Тараса Шевченка

E-mail: chemikdd@mail.ru, kurkina_tanya@ukr.net

Система протеїну С становить важливу ланку регуляції численних фізіологічних і патофізіологічних процесів організму. Розглянуто особливості структури протеїну С та механізми його активації. Особливу увагу приділено функціонуванню активованого протеїну С, його антикоагулянтним, протизапальним і профібринолітичним властивостям. З'ясовується можливе терапевтичне застосування препарату протеїну С для лікування багатьох патологій, що характеризуються дефіцитом цього білка. Описано існуючі джерела та підходи до одержання препарату протеїну С.

Ключові слова: протеїн С, гемостаз, антикоагулянт, запалення.

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, серцево-судинні захворювання є найпоширенішими серед неінфекційних хвороб. Велику роль у розвитку ускладнень і високій смертності від серцево-судинних захворювань відіграють їхній тісний взаємозв'язок з багатьма хронічними недугами, посилення ризику при гострих хворобах, а також відсутність досконалих методів діагностики, прогнозування та лікування різноманітних патологій. Пошук засобів вдосконалення існуючих методик і впровадження передових підходів для лікування подібних відхилень є вкрай актуальним завданням. Сучасні методики лікування мають враховувати ключові фізіологічні й біохімічні процеси, яким часто притаманний надсистемний характер. Останнім часом дедалі більшу увагу дослідників привертають молекулярні механізми, що лежать в основі взаємодії різних фізіологічних та біохімічних систем. Так, система гемостазу крові перебуває у тісному зв'язку з ланкою імунної системи, що відповідає за ініціацію та розвиток запальних процесів. Регуляція запальних і гемостатичних процесів — це складні й багатокомпонентні каскади реакцій, що перебігають на різних рівнях, підсилюючи чи інгібуючи один одного. Од-

ним із білків плазми крові, що регулює як запальні, так і гемостатичні реакції, є протеїн С [1]. Завдяки значній функціональній значущості протеїн С видається одним з потенційних засобів лікування серцево-судинних захворювань і тромботичних ускладнень, що зумовлені запальними агентами або, навпаки, спричинюють їх появу.

Гемостаз забезпечує циркуляцію крові у рідкому стані кровоносними судинами організму і зупинку кровотеч у разі ушкодження судин. Ці функції виконують три ланки гемостазу: система зсідання крові, фібринолітична та антикоагулянтна системи. Протеїн С є гуморальним компонентом системи гемостазу, проте функціонування цього білка тісно пов'язано з її тканинними і тромбоцитарними компонентами. Дія протеїну С полягає у виконанні антикоагулянтних функцій, модуляції фібринолізу і запалення, індукції сигнальних шляхів.

Ще в 1960 р. Seegers W. відкрив активований протеїн С (названий тоді автопротромбіном ІІа) і показав його здатність пригнічувати зсідання крові [2,3]. Неактивний протеїн С уперше було виділено Stenflo J. у 1979 р. з бичачої плазми в комплексі з вітаміном К-залежними білками, що розділялися іонообмінною хроматографією на

ДЕАЕ-сефарозі. Згодом цей білок назвали протеїном С; він виявився проферментом відкритого раніше активованого протеїну С [4].

Структура протеїну С. У крові може циркулювати як одно-, так і дволанцюгова форма протеїну С з переважанням останньої. Концентрація протеїну С у плазмі є досить низькою (2–5 мкг/мл або 40–80 нМ). Легкий ланцюг дволанцюгового протеїну С містить Glu-домен, до складу якого входять 9 залишків γ -карбоксихлутамінової кислоти. Саме тому протеїн С відносять до групи вітамін К-залежних білків. γ -Карбоксильованими є залишки глутамату в положеннях 6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26 і 29 [5]. Asp71 піддається β -гідроксилюванню [6]. До складу протеїну С також входять два домени, подібні до епідермального фактора росту (Epidermal Growth Factor domain — EGF). Основну частину важкого ланцюга становить типовий для серинових протеїназ каталітичний домен. Також важкий ланцюг містить NH₂-кінцевий активаційний пептид, що містить 12 амінокислотних залишків (рис. 1). Молекулярна маса протеїну — 62 кДа (21 кДа і 41 кДа для легкого і важкого ланцюгів відповідно). Вуглеводна частина молекули становить 23% від маси. Глікозилюваними у протеїну С є амінокислотні залишки Asn 97, Asn248, Asn313 і Asn329. Глікозилювання цих сайтів впливає на секрецію, подальший процесинг, інгібіторні властивості Ca²⁺ відносно активації протеїну С тромбіном без тромбомодуліну та на Е-селектинопоередковану клітинну адгезію [7, 8]. Ізоелектрична точка протеїну С лежить у межах рН 4,4–4,8. Коефіцієнт екстинкції E²⁸⁰_{1%} = 14,5. Час півжиття у плазмі — 8–12 годин. Ген протеїну С людини містить 8 екзонів та локалізується на хромосомі 2q13–q14. Унаслідок трансляції утворюється поліпептидний ланцюг, у якому 42 амінокислотні залишки складає літерна послідовність, 155 — легкий ланцюг, 262 — важкий ланцюг [9].

Активация протеїну С відбувається на мембрані ендотеліальних клітин і тромбоцитів (рис. 2). В основі активації лежить реакція відщеплення активаційного пептиду тромбіном. Однак для здійснення цієї реакції тромбіну необхідно перемкнутися зі шляху зсідання на шлях протизсідання. Білком, що забезпечує таке перемикання, є тромбомодулін. Внаслідок зв'язування з ним тромбін перестає виконувати прокоагулянтні функції, тобто перетворювати фібриноген на фібрин та активувати тромбоцити, фактори V і XIII. При цьому в 1 000 разів зростає здатність тромбіну зв'язувати й активувати

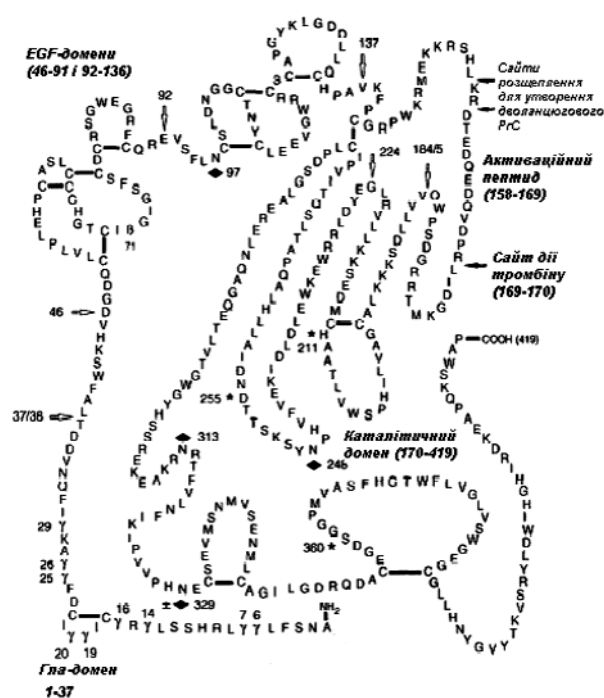


Рис 1. Схема первинної структури протеїну С:
* — амінокислотні залишки активного центру;
◆ — глікозилювані амінокислотні залишки;
▲ — залишки γ -карбоксихлутамінової кислоти [10]

протеїн С [11]. У процесі активації протеїну С суттєва роль належить іонам кальцію і мембранним фосфоліпідам [12]. Також в активації бере участь ендотеліальний рецептор протеїну С (Endothelial cell Protein C Receptor — EPCR), що посилює цю реакцію у 20 разів. EPCR міститься на мембранах клітин артерій. На поверхні тромбоцитів активація протеїну С стимулюється тромбоцитарним фактором 4 (Platelet Factor 4 — PF4). Окрім тромбіну, протеїн С може бути активований фактором Ха. Ця реакція посилюється фактором Va. Також як специфічні активатори протеїну С можуть використовуватися активатори з отрут щитомордника. Неспецифічно протеїн С може бути активований трипсином і активатором фактора X з отрути гадюки Рассела. Фізіологічними інгібіторами активованого протеїну С у плазмі є α_1 -інгібітор протеїназ [13], α_2 -макроглобулін [14], α_2 -антиплазмін і гепарин-стимульований інгібітор протеїну С (protein C inhibitor — PCI) [15]. На поверхні тромбоцитів нексин I [16,17], а також вітронектин у комплексі з інгібітором активатора плазміногену контролюють дію активованого протеїну С [18].

Як же протеїн С здійснює антикоагулянтні функції? Відомо, що перетворення протромбіну на тромбін опосередковано

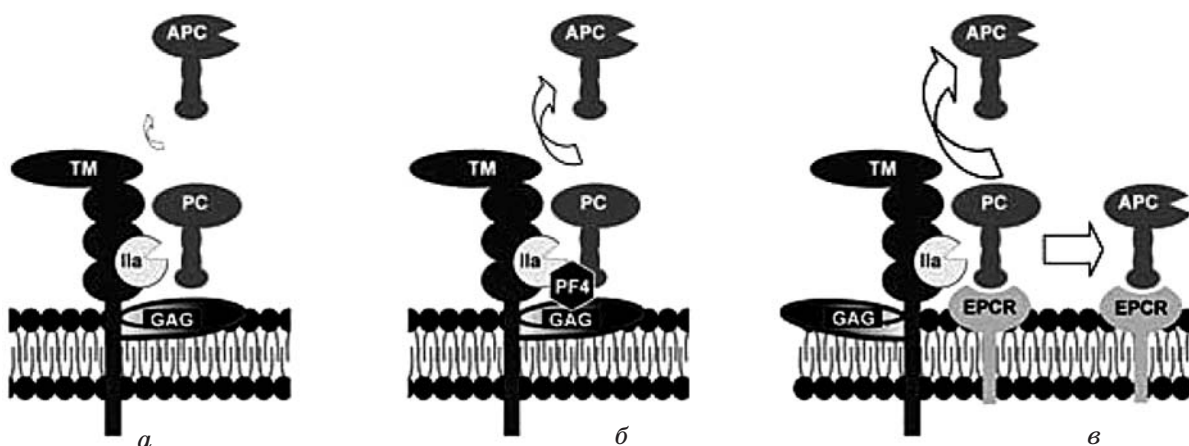


Рис. 2. Активація протеїну С (розміщено в порядку зростання швидкості активації):

a — механізм активації комплексом тромбін–тромбомодулін — сульфатований глікозаміноглікан;

б — із залученням тромбоцитарного фактора 4 на поверхні тромбоцитів;

в — із залученням епідермального рецептора протеїну С на поверхні епітеліальних клітин великих артерій.

APC — активований протеїн С; IIa — тромбін;

PC — протеїн С; GAG — глікозаміноглікан;

PF4 — тромбоцитарний фактор 4; TM — тромбомодулін;

EPCR — рецептор протеїну С ендотеліальних клітин [19]

формуванням білкових комплексів (теназного — фактори VIII, IX і протромбіназного — фактори X, V) на мембрані активованих клітин судин. Фактори VIIa і Va є кофакторами активації протеїназ з'єднання. У процесі генерації тромбіну він сам посилює свою подальшу активацію шляхом активування факторів VIII і V. Дія активного протеїну С спрямована на розщеплення цих факторів і таким чином на інгібування генерації тромбіну [20].

Збалансований рівень білків гемостазу в плазмі забезпечує активацію протеїну С генерованим тромбіном. Активований протеїн С запобігає підсиленню продукування тромбіну через інактивацію кофакторів цього процесу. Паралельно в нормальному режимі працює фібриноліз, що забезпечує розчинення недоцільно утворених полімерів фібрину. Інактивація факторів VIIa і Va активованим протеїном С пришвидшується за наявності Ca^{2+} і фосфоліпідів. Спорідненість активного протеїну С до фосфоліпідів підвищує протеїн S, що також є вітамін К-залежним білком і синтезується печінкою, ендотеліальними клітинами і тромбоцитами. Наявність іонів Ca^{2+} є важливим регульовальним фактором у функціонуванні протеїну С, оскільки вони не лише стимулюють активацію зимогену тромбіном у присутності тромбомодуліну, а й інгібують активацію за його відсутності. Розміщена поряд з Ca^{2+} -зв'язувальним сайтом протеазного домену автолітична петля протеїну С (залиш-

ки 301–316) на 5 амінокислотних залишків довша від цієї самої структури в інших серинових протеаз. Вважають, що ця петля, просторово взаємодіючи з активаційним пептидом, відіграє вирішальну роль у підтримці конформації зимогену, що не піддається розщепленню тромбіном за відсутності тромбомодуліну [21].

Важливу роль відіграє протеїн С також як профібринолітик. У численних експериментах *in vivo* й *in vitro* показано здатність активованого протеїну С стимулювати фібриноліз, однак механізм цієї реакції ще повною мірою не з'ясовано. Видається вірогідною ідея про посилення фібринолізу через інгібування генерації тромбіну, що призводить до зменшення активації інгібітора фібринолізу, який активується тромбіном (TAFI) [22], а також пригнічення низки процесів, зумовлених тромбіном, у тому числі й секреції інгібіторів активаторів плазміногену. TAFI інгібує фібриноліз, відщеплюючи С-кінцеві лізини фібрину, що є місцем зв'язування плазміногену — проформи ключового ферменту фібринолізу. Подібно до протеїну С, активація TAFI забезпечується комплексом тромбін–тромбомодулін. Таким чином, на рівні цього комплексу відбувається балансування процесів з'єднання крові та фібринолізу. За умов запалення вірогіднішою є активація TAFI, оскільки окисні реакції, характерні для вогнища запалення, не зачіпають важливі для цього процесу сайти в молекулі тромбомодуліну,

тимчасом як здатність активувати протеїн С значно зменшується. Досліджуючи хворих на діабет, виявили кореляцію рівня циркулюючого ТАФІ і комплексу АРС-РСІ, що свідчить про сприяння АРС фібринолізу через модуляцію дії ТАФІ. Проте значне зменшення відношення концентрації D-димерів до комплексів тромбіну з антитромбіном III (DD/ТАТ) у цих пацієнтів порівняно з контролем дозволяє припустити, що рівень АРС недостатній для протидії пригніченню фібринолізу [23].

Деякі вчені запропонували механізм регуляції фібринолізу через комплексоутворення з інгібітором активатора плазміногену (РАІ-1) і вивільнення активаторів плазміногену [25]. Так, антикоагулянтний ефект протеїну С значно ослаблений на активованих тромбоцитах. Активовані тромбоцити виділяють велику кількість РАІ-1 і вітронектину. Вітронектин у 300 разів посилює інгібування активованого протеїну С інгібітором активатора плазміногену-1 (константа швидкості другого порядку $1,8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ порівняно з $5,7 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ у разі системи без вітронектину). Отже, РАІ-1 може бути основним фізіологічним інгібітором активованого протеїну С за умов гострої фази, коли посилюються прокоагулянтні процеси [18]. Тому нейтралізації протитромболітичного і прокоагулянтного ефекту РАІ-1 можна досягти шляхом уведення екзогенного АПС пацієнтам, яких лікують тромболітиками. Так, позитивний ефект спостерігався під час уведення АПС пацієнтам з гострим інфарктом міокарда, яких лікували рекомбінантним тканинним активатором плазміногену. Крім того, активований протеїн С інгібує продукування TNF- β , що стимулює експресію РАІ-1 ендотеліальними клітинами [26].

Участь протеїну С у регуляції запальних процесів є яскравим прикладом функціональної залежності процесів запалення і коагуляції (рис. 3). Ініціатором зсідання є контакт тканинного фактора з кров'ю. У нормі тканинний фактор представлений клітинами у місцях, ізольованих від крові. Порушення цілісності тканин призводить до припинення цієї ізоляції. При цьому утворюється комплекс тканинного фактора з фактором VII, що зумовлює активацію фактора X і утворення тромбіну. При запаленнях, спричинених патологіями, і потрапленні в кров'яне русло ендотоксину, що супроводжується запаленням, моноцити і ендотеліальні клітини можуть бути стимульовані до експресії тканинного фактора. Це може спричинити активацію зовнішнього механізму зсідання крові і генерації тромбіну. Тромбін є підси-

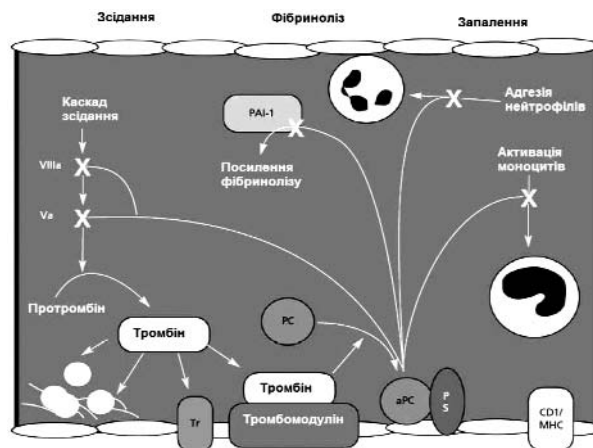


Рис. 3. Роль активованого протеїну С в регуляції запалення, зсідання крові та фібринолізу: РС — протеїн С; аРС — активований протеїн С; PS — протеїн S; РАІ-1 — інгібітор активатора плазміногену першого типу; Tr — рецептор тромбіну; CD1/МНС — головний комплекс гістосумісності; Va — активований фактор V; VIIIa — активований фактор VIII [24]

лювачем запальних реакцій. Як активатор тромбоцитів, він індукує секрецію білків адгезії, стимуляторів хемотаксису моноцитів, тромбоцитарного фактора росту. Також тромбін є мітогеном для більшості клітин, що реалізують запалення. Активація тромбіном тканинних фібробластів індукує секрецію фактора росту судинного ендотелію і простагландину E_2 .

Наслідком запалення є пригнічення фібринолізу і зниження антикоагулянтного потенціалу плазми, у тому числі й у зв'язку з інгібуванням шляху протеїну С. Причинами зниження протеїн С-обумовленого антикоагулянтного потенціалу плазми при запаленнях є блокування медіаторами запалення IL-1 і TNF- α , а також ендотоксинами транскрипції генів тромбомодуліну і ендотеліального рецептора протеїну С, збільшення кількості вищеплюваних із мембрани молекул тромбомодуліну та ендотеліального рецептора протеїну С, пов'язане зі збільшенням кількості окисників у вогнищі запалення, окиснення метіоніну в молекулі тромбомодуліну, що зумовлює зменшення його кофакторної активності в реакції активації протеїну С, а також підвищення рівня С4b-зв'язувального білка, який утворює комплекси з протеїном S, позбавляючи його можливості виступати кофактором активного протеїну С [1].

Велика кількість експериментальних даних підтвердила важливу роль активованого протеїну С як протизапального агента.

Його протизапальна дія виявляється у впливі на моноцити (він зменшує продукування ІІ-1, TNF- α), інгібуванні ролінгу нейтрофілів, захисті епітеліальних клітин від загибелі. Індукцію сигнальних шляхів спричинює протеолітична активація PAR-1 рецепторів активованим протеїном С у комплексі з EPCR. Показано антиоксидантну, цитопротекторну і антиапоптичну дію активованого протеїну С та розглядається можливість застосування його на противагу згубним для нервової системи ефектам рекомбінантного тканинного активатора плазміногену [27, 28]. У свою чергу, зменшення запалення сприяє зниженню прокоагулянтних і протифібринолітичних властивостей плазми загальною, що, знову ж таки, має сприяти зменшенню запалення. Тому патології в системі протеїну С спричинюють серйозні порушення діяльності всього організму.

Існує низка хвороб, безпосередньо пов'язаних із дисфункцією протеїну С. Так, відома спадкова недостатність протеїну С двох типів: тип І, зумовлений зниженням синтезу протеїну С печінкою, і тип ІІ, пов'язаний з дефектами структури молекули. Рівень протеїну С перебуває в межах норми, але він втрачає здатність до взаємодії з тромбіном. Спадкова недостатність протеїну С може бути як гетерозиготною (частота — 1 випадок серед 200–300 дорослих), так і гомозиготною (1 випадок на 160 000–360 000 новонароджених). Серйозні клінічні симптоми з'являються, коли концентрація протеїну С перебуває на рівні 20–25% від норми. У такому разі судини шкіри, очей, нирок і мозку найбільшою мірою схильні до некрозів і тромбозів [29, 30].

Дефіцит протеїну С, як й інших антикоагулянтів, — досить рідкісне явище, на відміну від резистентності до активованого протеїну С. Ця хвороба характеризується мутацією гена фактора V, за якої фактор Va втрачає здатність до інактивації протеїну С. Ще частішими є випадки набутої недостатності протеїну С, що може бути спричинено хворобами печінки, ДВС-синдромом, лікуванням антагоністами вітаміну К, злоякісними новоутвореннями й іншими патологіями [31].

Ключова роль протеїну С у захисних системах організму зумовила потребу в одержанні очищеного препарату цього білка. Для отримання концентрату протеїну С використовують плазму крові, культуру клітин та молоко трансгенних тварин. Кожне із цих вихідних джерел має певні недоліки та переваги. Так, одержання протеїну С з куль-

тури *E. coli* є відносно недорогим та ефективним засобом, однак синтезований таким чином протеїн С може бути неактивним через неправильний фолдинг або посттрансляційне глікозилювання. Препарат протеїну С, отриманий з молока трансгенних тварин, є досить дорогим, але його фолдинг та посттрансляційні модифікації є більш відповідними до природного білка. Вже одержано препарат з молока трансгенних свиней з концентрацією протеїну С 1 г/л (для порівняння: концентрація протеїну С у плазмі людини — 4 мг/л) [32]. Однак технологія подальшого очищення протеїну С з молока трансгенних тварин виявилась украй неефективною. Кінцевий вихід цільового білка становив лише 24%, головним чином через значні втрати протеїну С на стадії відділення від казеїнів молока [33].

У подальшому було запропоновано використання методу очищення протеїну С з молока трансгенних тварин на основі металоафінної хроматографії на залізовмісному сорбенті. Таким чином вдалося досягти відділення протеїну С від α -лактальбуміну, β -лактоглобуліну та казеїнів, однак, як свідчили результати перевірки амідолітичної активності очищеного препарату, кінцевий вихід протеїну С був невисоким. Автори роботи вважають, що значна кількість протеїну С залишилася зв'язаною з колонкою [34]. Отже, хоча використання трансгенних тварин для одержання протеїну С має свої переваги, цей метод є досить високовартісним. Окрім того, отримані з молока трансгенних тварин білки можуть викликати у пацієнтів алергійні реакції. Відомо, що домішка денатурованих похідних у нативних білках сприяє ініціації аутоімунних процесів відносно нативної ізоформи, що зумовлює виникнення тяжких патологічних ускладнень [35]. Тому для отримання протеїну С актуальним залишається використання донорської плазми та її фракцій. Найефективнішим методом для очищення протеїну С вважають імуноафінну хроматографію. Ще в 1995 р. Ortner та співавтори запропонували метод імуноафінного очищення, поєднаний з вірусною інактивацією препарату Pr С [36]. Для вірусної інактивації було розроблено сольвентдетергентний прийом, завдяки якому здійснювалась інактивація вірусу СНІДу. Протеїн С було очищено в 13 600 разів порівняно з препаратом плазми, кінцевий продукт мав специфічну активність 231 одиниця/мг [36]. Незважаючи на високу ефективність цього методу, деякі автори [37, 38] відзначають його

недоліки, пов'язані із забрудненням кінцевого продукту антитілами мишей. До того ж технологія використання моноклональних антитіл дуже високовартісна.

Оскільки перед хроматографічним очищенням препарату протеїну С донорська плазма потребує додаткових етапів очищення (адсорбція вітамін К-залежних білків на сульфаті барію, фракціонування сульфатом амонію), деякі автори вважають за доцільне використання фракції IV-1 за Коном. З літературних джерел відомо, що ця фракція містить близько 100 мкг протеїну С на 1 г пасти [39]. Але крім Pr C, фракція IV-1 за Коном містить й інші білки: альбумін, α -1-антитрипсин, антитромбін III, церулоплазмін, протромбін тощо. Деякі з цих білків є інгібіторами активованого протеїну С, тому присутність їх в очищеному препараті є небажаною [40]. Фракції IV та IV-1 за Коном є зручним джерелом для одержання Pr C, тому що це побічний продукт у процесі фракціонування плазми крові з метою отримання сироваткового альбуміну. У вітчизняній фармакологічній промисловості ці фракції використовують для одержання препарату полібіоліну [41]. Доведено, що полібіолін має протизапальну дію. Цілком імовірно, що певною мірою це зумовлено присутністю в цьому препараті Pr C та церулоплазміну, для яких теж визначено проти-запальний ефект. У разі очищення фракції IV за Коном доцільним є послідовне використання іонообмінної хроматографії на ДЕАЕ-FF-сефарозі та хроматографії на металоафінному сорбенті [42]. За даними цих авторів, завдяки сумісному використанню зазначених носіїв, можна досягти очищення фракції IV-1 за Коном у 128 разів.

Підсумовуючи дані щодо очищення протеїну С з різних джерел, можна зробити висновки, що найбільш доцільним для розроблення препарату протеїну С може бути очищення IV-1 фракції за Коном та послідовне очищення препарату на іонообміннику та металоафінному сорбентах. Слід також зазначити, що внаслідок складної багатомодульної будови протеїну С належить до лабільних білків, що схильні до аутоінактивації та потребують розроблення спеціальних методів збереження нативної структури [35].

Застосуванню протеїну С з терапевтичною метою присвячено чимало робіт. Велику роль у цих дослідженнях відіграла програма PROWESS (Recombinant Human Activated Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis), що завершилась уведенням

до клінічної практики рекомбінантного активованого протеїну С Xigris [*Drotrecogin alpha* (Eli Lilly, США/Німеччина)] для лікування тяжкого сепсису з високим ризиком летального кінця. Використання активованого протеїну С у клініці продемонструвало зниження смертності від сепсису на 19,4%. При цьому ризик масивних кровотеч дорівнював 3,5% у досліджуваній групі (проти 2% у контрольній). Водночас у рамках дослідження RESOLVE (REsearching severe Sepsis and Organ dysfunction in children: a gLobal perspective) підтвердити ефективність активованого рекомбінантного протеїну С у дітей з тяжкою формою сепсису не вдалося [43].

Окрім рекомбінантного, зареєстровано отримані з плазми крові людини препарати протеїну С Ceprotin (Baxter International, Австрія) і Protexel (LFB, Франція) [44], а також його активної форми AnactC (Kaketsuken, Японія) [45]. Вони призначені для запобігання і лікування венозних тромбозів і геморагічної висипки за значної вродженої недостатності протеїну С. Донедавна ці препарати були зареєстровані лише на внутрішніх (європейському чи японському) ринках. Але в березні 2007 р. американська Агенція з контролю якості їжі і лікарських препаратів (Food and Drug Administration, FDA) схвалила використання Ceprotin для лікування вродженої недостатності цього білка. В Європі цей препарат було затверджено ЕМЕА ще в 2001 р. Відзначається ефективність препаратів протеїну С при терапії набутієї недостатності цього білка [29].

Виходячи з наведених даних про властивості протеїну С, видається доцільним подальше розроблення методів його одержання, вивчення функціональної ролі, а також дослідження застосування цього білка чи його активної форми для запобігання повторному тромбоутворенню і патологічним наслідкам експресії значної кількості PAI-1, для корекції запальних процесів, як нейрорепротектора при інсульті та для лікування дефіциту протеїну С. Враховуючи вагомість системи протеїну С у регуляції як запальних, так і гемостатичних процесів, модуляція вмісту її компонентів може стати основою прогресивних і якісно нових стратегій лікування серцево-судинних та багатьох інших захворювань [46, 47, 48].

ЛІТЕРАТУРА

1. *Esmon C.* The anticoagulant and anti-inflammatory roles of the protein C anticoagulant pathway // *J. Autoimmun.* — 2000. — V. 15, N2. — P. 113–116.
2. *Mammen E., Thomas W., Seegers W.* Activation of purified prothrombin to autoprothrombin I or autoprothrombin II (platelet cofactor II) or autoprothrombin II-A // *Thromb Diath Haemorrh.* — 1960. — V. 5. — P. 218–249.
3. *Seegers W., Novoa E., Henry R., Hassouna H.* Relationship of «new» vitamin K-dependent Protein C and «old» autoprothrombin II-a // *Thromb Res.* — 1976. — V. 8, N5. — P. 543–552.
4. *Stenflo J.* A new vitamin K-dependent protein. Purification from bovine plasma and preliminary characterization // *J. Biol. Chem.* — 1976. — V. 251, N2. — P. 355–363.
5. *Beckmann R., Schmidt R., Santerre R. et al.* The structure and evolution of a 461 amino acid human protein C precursor and its messenger RNA, based upon the DNA sequence of cloned human liver cDNAs // *Nucleic Acids Research.* — 1985. — V. 13, N14. — P. 5233–5247.
6. *Drakenberg T., Femlund P., Roepstorff P. et al.* β -Hydroxyaspartic acid in vitamin K-dependent protein C // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1983. — V. 80, N7. — P. 1802–1806.
7. *Grinnell S., Walls J., Gerlitz B.* Glycosylation of human protein C affects its secretion, processing, functional activities, and activation by thrombin // *J. Biol. Chem.* — 1991. — V. 266, N15. — P. 9778–9785.
8. *Grinnell S., Hermann R., Yan S.* Human protein C inhibits selectin-mediated cell adhesion: role of unique fucosylated oligosaccharide // *Glycobiology.* — 1994. — V. 4, N2. — P. 221–225.
9. *Patracchini P., Aiello V., Palazzi P. et al.* Sublocalization of the human protein C gene on chromosome 2q13-q14 // *Hum. Genet.* — 1989. — V. 81, N2. — P. 191–192.
10. *Castellini F.* Human protein C and activated protein C // *Trends Cardiovasc. Med.* — 1996. — V. 5, N2. — P. 55–62.
11. *Esmon N., Owen W., Esmon C.* Isolation of a membrane-bound cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C // *J. Biol. Chem.* — 1982. — V. 257, N2. — P. 859–864.
12. *Kisiel W., Canfield W., Ericsson L. et al.* Anticoagulant properties of bovine plasma protein C following activation by thrombin // *Biochemistry.* — 1977. — V. 16, N26. — P. 5824–31.
13. *Van der Meer F., van Tilburg N., van Wijngaarden A.* A second plasma inhibitor of activated protein C: α 1-antitrypsin // *Thromb Haemost.* — 1989. — V. 62, N2. — P. 756–762.
14. *Hoogendoorn H., Toh C., Nesheim M. et al.* Alpha 2-macroglobulin binds and inhibits activated protein C // *Blood.* — 1991. — V. 78, N9. — P. 2283–2290.
15. *Laurel M., Stenflo J., Carlson T.* Turnover of *I-protein C inhibitor and *I-antitrypsin and their complexes with activated protein C // *Ibid.* — 1990. — V. 76, N11. — P. 2990–2995.
16. *Hermans J., Stone S.* Interaction of activated protein C with serpins // *Biochem. J.* — 1993. — V. 295, N1. — P. 239–245.
17. *Suzuki K., Nishioka J., Hashimoto S.* Protein C inhibitor: purification from human plasma and characterization // *J. Biol. Chem.* — 1983. — V. 258, N1. — P. 163–168.
18. *Rezaie A.* Vitronectin Functions as a Cofactor for Rapid Inhibition of Activated Protein C by Plasminogen Activator Inhibitor-1 // *Ibid.* — 2001. — V. 276, N19. — P. 15567–15570.
19. *Laurent O., Mosnier J., Griffin H.* Protein C anticoagulant activity in relation to anti-inflammatory and anti-apoptotic activities // *Frontiers in Bioscience.* — 2006. — V. 11. — P. 2381–2399.
20. *Davie E., Fujikawa K., Kisiel W.* The coagulation cascade: Initiation, maintenance and regulation // *Biochemistry.* — 1991. — V. 30, N43. — P. 10363–10370.
21. *Yang L., Manithody C., Rezaie A.* The functional significance of the autolysis loop in protein C and activated protein C // *Thromb Haemost.* — 2005. — V. 94, N1. — P. 60–68.
22. *Gresele P., Momi S., Berrettini M. et al.* Activated Human Protein C Prevents Thrombin-induced Thromboembolism in Mice. Evidence that Activated Protein C Reduces Intravascular Fibrin Accumulation through the Inhibition of Additional Thrombin Generation // *J. Clin. Invest.* — 1998. — V. 101, N3. — P. 667–676.
23. *Yano Y., Gabazza E., Hori Y. et al.* Association Between Plasma Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor Levels and Activated Protein C in Normotensive Type 2 Diabetic Patients // *Diabetes Care.* — 2002. — V. 25, N7. — P. 1245–1246.
24. *Dettenmeier P., Swindell B., Stroud M. et al.* Role of Activated Protein C in the Pathophysiology of Severe Sepsis // *Am. J. Crit. Care.* — 2003. — V. 12, N.6. — P. 518–526.
25. *Sakata Y., Loskutoff D., Gladson C. et al.* Mechanism of protein C-dependent clot lysis: role of plasminogen activator inhibitor // *Blood.* — 1986. — V. 68, N6. — P. 1218–1223.
26. *Sakamoto T., Ogawa H., Takazoe K. et al.* Effect of activated protein C on plasma plasminogen activator inhibitor activity in patients with acute myocardial infarction treated with alteplase. Comparison with

- unfractionated heparin // *J. Am. Coll. Cardiol.* — 2003. — V. 42, N8. — P. 1389–94.
27. *Cheng T., Liu D., Griffin J. et al.* Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective // *Nat. Med.* — 2003. — V. 9. — P. 338–342.
 28. *Cheng T., Petraglia A., Li Z.* Activated protein C inhibits tissue plasminogen activator-induced brain hemorrhage // *Ibid.* — 2006. — V. 12, N11. — P. 1278–1285.
 29. *Kleijin E. de, Groot R. de, Hack E. et al.* Activation of protein C following infusion of protein C concentrate in children with severe meningococcal sepsis and pupura fulminans: a randomized, double-blinded, placebo-controlled, dose-finding study // *Crit. Care Med.* — 2003. — V. 31, N6. — P. 1839–184.
 30. *Emmerich J., Vossen C., Callas P. et al.* Chronic venous abnormalities in symptomatic and asymptomatic protein C deficiency // *J. Thromb. Haemost.* — 2005. — V. 3, N7. — P. 1428–1431.
 31. *Bucciarelli P., Rosendaal F., Tripodi A. et al.* Risk of venous thromboembolism and clinical manifestations in carriers of antithrombin, protein C, protein S deficiency, or activated protein C resistance: a multicenter collaborative family study // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 1999. — V. 19, N4. — P. 1026–33.
 32. *Velander W., Johnson I., Page R. et al.* High-Level Expression of a Heterologous Protein in the Milk of Transgenic Swine Using the cDNA Encoding Human Protein C // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1992. — V. 89, N24. — P. 12003–12007.
 33. *Drohan W., Wilkins D., Latimer E. et al.* A scalable method for the purification of recombinant human protein C from the milk of transgenic swine in *Advances in bioprocess engineering.* — Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. — P. 501–507.
 34. *Wu H., Bruley D.* Chelator, metal ion and buffer studies for protein C separation // *Comparative Biochemistry and Physiology — Part A: Molecular & Integrative Physiology.* — 2002. — V. 132, N1. — P. 213–220.
 35. *Шевель М. В., Вережка С. В.* Автоповреждения белковых препаратов: молекулярные механизмы и пути их предотвращения // *Совр. пробл. токсикол.* — 2006. — №3. — С. 41–45.
 36. *Ortner C., Ralston A., Gee D. et al.* Large-scale production and properties of immunoaffinity-purified human activated protein C concentrate // *Vox Sang.* — 1995. — V. 69, N4. — P. 309–318.
 37. *Bruley D., Droxan W.* Protein C and related anticoagulants advances in applied biotechnology series: Culf Publishing Company: Houston, TX. — 1990. — V. 11. — P. 11–27.
 38. *Wu H., Bruley D. F.* Homologous human blood protein separation using immobilized metal affinity chromatography: Protein C separation from prothrombin with application to the separation of factor IX and prothrombin // *Biothechnol. Prog.* — 1999. — V. 15, N5. — P. 928–931.
 39. *Bertina R.M.* Protein C and related proteins, biochemical and clinical aspects. — Churchill Livingstone: New York, 1998. — P. 1–54.
 40. *Волков Г. Л., Платонова Т. Н., Савчук А. Н. и др.* Современные представления о системе гемостаза. — К.: Наук. думка, 2005. — 296 с.
 41. *Качаровский Б. В., Криворучко Р. А., Миндюк М. В.* Типовой регламент производства полибиоллина. — К.: Мин-во здравоохранения УССР, 1975.
 42. *Wu H., Bruley D.* Process scale-up studies for protein C separation using IMAC // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 2005. — V. 599. — P. 61–66.
 43. *Nadel S. et al.* Drotrecogin alfa (activated) in children with severe sepsis: a multicentre phase III randomised controlled trial // *Lancet.* — 2007. — V. 369, N10. — P. 836–43.
 44. *Dreyfus M., Ladouzi A., Chambost H. et al.* Treatment of inherited protein C deficiency by replacement therapy with the French purified plasma-derived protein C concentrate (PROTEXEL®) // *Vox Sanguinis.* — 2007. — V. 93, N3. — P. 233–240.
 45. *Hajime T.* Human activated protein C. *Anact C.* // *Clinics & Drug Therapy.* — 2001. — V. 20, N4. — P. 426–427.
 46. *Genc K.* The rationale for activated protein C treatment in perinatal white matter injury // *Medical Hypotheses.* — 2007. — V. 68, N6. — P. 1418–1419
 47. *Genc K.* Activated protein C: Possible therapeutic implications for multiple sclerosis // *Ibid.* — 2007. — V. 68, N3. — P. 710.
 48. *Genc K.* Activated protein C: Therapeutic implications for Alzheimer's disease // *Ibid.* — 2007. — V. 69, N3. — P. 701–702.

**ПРОТЕИН С:
МЕХАНИЗМЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ
И МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ**

Д. Д. Жерносеков¹, Т. В. Куркина^{1,2}

¹Институт биохимии им. А.В. Палладина
НАН Украины, Киев

²Киевский национальный университет имени
Тараса Шевченко

*E-mail: chemikdd@mail.ru,
kurkina_tanya@ukr.net*

Система протеина С составляет важное звено многих физиологических и патофизиологических процессов организма. Рассмотрены особенности структуры протеина С и механизмы его активации. Особое внимание уделено функционированию активного протеина С, его антикоагулянтным, противовоспалительным и профибринолитическим свойствам. Рассматривается возможное терапевтическое применение препарата протеина С для лечения многочисленных патологий, характеризующихся дефицитом этого белка. Описаны существующие источники и подходы для получения препарата протеина С.

Ключевые слова: протеин С, гемостаз, антикоагулянт, воспаление.

**PROTEIN C:
MECHANISMS OF FUNCTIONING
AND PRODUCTION METHODS**

D. D. Zhernosekov¹, T. V. Kurkina^{1,2}

¹Palladin Institute of Biochemistry
of National Academy of Sciences of Ukraine,
Kyiv

²Taras Shevchenko Kyiv National University

*E-mail: chemikdd@mail.ru,
kurkina_tanya@ukr.net*

Protein C pathway is an important link in numerous physiological and pathophysiological processes of organism. The particular features of protein C structure and mechanisms of its activation are considered. Special attention is given to functioning of activated protein C, to its anticoagulant, anti-inflammatory and profibrinolytic properties. Possible therapeutic application of protein C for the treatment of large number of pathologies characterized by protein C deficiency is observed. Current sources and approaches for protein C preparation are described.

Key words: protein C, hemostasis, anticoagulant, inflammation.

БІОЕТАНОЛ ЯК АЛЬТЕРНАТИВНЕ ПОНОВЛЮВАНЕ ДЖЕРЕЛО ЕНЕРГІЇ

К. А. ЛАРЧЕНКО¹, Б. В. МОРГУН²

¹ Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Київ

² Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ

E-mail: larchenko@ifrg.kiev.ua

Розглянуто проблему альтернативних джерел енергії. Головну увагу приділено виробництву біопалива, зокрема біоетанолу, в Україні й світі. Наведено технологію виготовлення біоетанолу з лігніноцелюлозної сировини, подано оцінку перспектив виробництва і використання біопалива.

Ключові слова: альтернативні джерела енергії, біоетанол, гідроліз, ферментація, крохмаль, цукор, кукурудза.

Інтенсивний пошук альтернативних поновлюваних джерел енергії у світі є одним з головних завдань, які стоять перед суспільством у XXI столітті. Стурбованість зумовлена скороченням запасів сирої нафти, ціна на яку сягає 580–730 дол. США за 1 т, негативним впливом на довкілля викидів газів, які спричиняють глобальні зміни клімату, і врешті-решт залежністю, навіть високо-розвинених країн, від постачальників енергоносіїв.

Індустріалізація та розширення транспортних мереж світу призвели до різкого попиту на нафтопродукти, а пальне, що базується на нафті, одержують із обмежених покладів, сконцентрованих лише у певних регіонах світу. Тому країни, які зовсім не мають таких покладів, змушені терміново шукати альтернативні поновлювані джерела палива, які можна було б виробляти з наявних матеріалів.

Європейська комісія планує поступово, до 2020 р., замінити у транспортному секторі близько 20% звичайних палив альтернативними з проміжним завданням 5,75% до 2010 р. У США акт про енергетичну політику зобов'язує досягти використання у змішаному вигляді 28,4 млрд. л альтернативного палива до 2012 р. [1]. Нещодавно президент США поставив завдання до 2025 р. замінити більш ніж 75% імпортованого палива альтернативним [2].

До альтернативних палив належать біодизель, біоетанол, біогаз та інші види.

Біодизель одержують у результаті реакції етерифікації рослинної олії метанолом.

Виробляють біодизель з олійних культур соняшнику, ріпаку, олійної редьки, ятрофи та деяких тропічних культур. У ЄС за його виробництвом лідирують такі країни, як Німеччина, Франція, Іспанія, Італія. Так, у 2003 р. Німеччина виробила 8 млн. гектолітрів дизельного пального на рослинній олії.

Біодизель є головним альтернативним транспортним паливом в Індії — країні, яка повністю залежить від імпорту нафти. Виробництво біодизеля там базується на паливі, що його виготовляють із ятрофи та поливних культур з добре розвинутою листостебловою масою [3,4].

У Швеції, Бельгії та деяких інших країнах біопаливо виробляють як із рослинної сировини, так і з відходів різних галузей виробництва, активованого мулу тощо [5].

У різних країнах світу проводяться інтенсивні дослідження та робиться оцінка використання як біопалива метилових складних ефірів вищих жирних кислот, одержаних із соняшникової, бавовняної та овочевої олій. Біодизель додають у звичайне дизельне пальне у співвідношеннях 1 до 9 або 2 до 8.

При цьому визначають характеристики й обсяг споживання біопалива, кількість викидних газів (вуглекислого, чадного, оксидів азоту) та сумарних не спалених вуглеводів. Окрім того, здійснюється перевірка зношуваності та руйнації частин двигуна, забруднення масляних та повітряних фільтрів, деградації мастил. Виявлено позитивні результати використання біодизельних сумішей порівняно з природним дизпаливом. Є повідомлення [6–9], що компоненти

дизельного палива, виготовленого на гідрогенізованій соняшниковій олії, є відмінними: вихід понад 90%, співвідношення і/п-парафінів 3,7:1–4,7:1, цетанові числа — 81–84 одиниці.

Найперспективнішим поновлюваним паливом вважається біоетанол. Поки що основним джерелом одержання біоетанолу є цукрова тростина та зернові культури, такі як пшениця і кукурудза. Так, у 2012 р. США планують виробити 22,7 млн. т біоетанолу з кукурудзи [10]. Уряд США субсидує американські спиртові заводи за допомогою податкового кредиту — 13,4 цента на літр з наданням подальших субсидій виробникам кукурудзи [11]. Бразилія майже 75% споживаної енергії виробляє в аграрному секторі й посідає перше місце у світі з виготовлення біоетанолу з цукрової тростини. У 2004 р. обсяг виробленого нею етанолу становив 37% від світового, і з 600 млн. л етанолу, імпортованих до США, 327 млн. літрів припадало на Бразилію [11].

Етанол використовують у широких масштабах у деяких європейських країнах, і він буде одним із домінуючих відтворюваних палив у транспортному секторі у найближчі 20 років. Його можна додавати до бензину або використовувати самостійно у спеціально пристосованих двигунах. Більш того, це добре паливо для майбутніх багатопаливних «гібридних» транспортних засобів [12].

У Франції виробляють два види біопалива: біодизель та біоетанол, який одержують головним чином із пшениці, цукрового буряку і кукурудзи. Обсяг виробництва біопалива у Франції до 2010 р. буде доведено до 1 300 тис. т [10].

У свою чергу багатообіцяльним методом виробництва водню з поновлювальних ресурсів є отримання його з біоетанолу. Найбільш використовуваними каталізаторами у даній реакції є родій і нікель, які сприяють дегідрогенізації етанолу. Ці каталізатори доповнюють біометалічними каталізаторами MgO, ZnO, CeO₂, La₂O₃. Дослідження в цьому напрямі перебуває ще на початковій стадії, використання біоетанолу для виробництва водню дає надію на його майбутнє застосування у паливних батареях [13].

Сировина для виготовлення біоетанолу, така як цукор і крохмаль, є досить дорогою, необхідною для харчування людей та на корм худобі, а тому утворення її дефіциту за дедалі зростаючого попиту на паливний етанол є неприпустимим. Аби зменшити собівартість біоетанолу, вартість сировини має

бути значно нижчою, а виробничий процес — оптимізований.

Як вважають світові лідери, майбутнє виробництво біоетанолу в значних масштабах базуватиметься на використанні лігніноцелюлозних матеріалів, що мають значні переваги. По-перше, ці джерела біопалива розподілені географічно рівномірніше, ніж поклади нафти та газу, а отже біоносії будуть більш доступні у кожній країні, що забезпечить безпеку поставок. По-друге, лігніноцелюозна сировина мінімізує потенційний конфлікт між використанням земель для виробництва продуктів і кормів та для виробництва енергетичної сировини. Така сировина дешевша порівняно зі звичайними кормами і може бути вироблена з малими витратами добрив, пестицидів і енергії. По-третє, біопаливо з лігніноцелюлози зменшує накопичення викидних газів у атмосфері, що є важливим для забезпечення чистоти довкілля та відвернення глобальних змін клімату. По-четверте, виробництво біопалива створить додаткові робочі місця в сільській місцевості.

Використання побічних продуктів, рослинної біомаси, відходів деревообробної промисловості та спеціальних культур з великою біомасою значно здешевить виробництво біопалива.

Підрaxовано, що в Канаді залишкова біомаса становить $1,45 \cdot 10^8$ т на рік, а її енергетична цінність — приблизно $2,28 \cdot 10^9$ Дж, що еквівалентно 22% річного використання енергії [14]. У разі анаеробного розщеплення цих залишків можна виробити до $1,4 \cdot 10^{10}$ м³ метану з енергетичною цінністю до $4,56 \cdot 10^8$ Дж. Окрім того можна застосувати нові технології, за яких замість метану виробляється водень (до $1,89 \cdot 10^8$ Дж). Воднем можна заряджати енергетичні батареї.

Найкращим джерелом для відновлюваного палива є залишки сільськогосподарських культур, зокрема стеблова маса кукурудзи. Рекомендовано для виготовлення біопалива скошувати стебла кукурудзи на висоті 40 см. У разі нижчого зрізання підвищується вміст вологи, залишки не покривають ґрунт, що важливо з позицій агротехніки, та збільшуються транспортні витрати на перевезення [15].

Грубі кукурудзяні післязбиральні залишки, як дешеві побічні відходи сільськогосподарського виробництва, мають високий вміст сухих речовин. Такі залишки подрібнюють, обробляють паром, додають звичайні дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*. За одночасної цукрофікації і бродіння

(ОЦБ) вихід етанолу залежить від вмісту глюкози та концентрації нерозчинних твердих частинок у суспензії, що перебродила.

Процес ОЦБ досліджувався на попередньо оброблених паром сухих кукурудзяних залишках з концентрацією 5,0; 7,5 та 10% нерозчинних у воді твердих частинок з додаванням 2,0 г/л гексозоферментуючих дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Якщо концентрація нерозчинних частинок менша 10%, вихід етанолу становить 25 г/л суспензії, що перебродила. Підвищення концентрації дріжджів до 5 г або культивування їх у передобробній рідині за даних умов не збільшували сумарний вихід етанолу [16].

На вихід етанолу впливає якість попередньої обробки біомаси. З'ясовано, що дрібніші частинки (до 90 мк) мають значно вищу концентрацію неорганічних речовин та вміст вологи, а фракція більших частинок мала вищий вміст вуглецю і нижчий — азоту, а також вищий вміст легких речовин. Найпомітнішою є різниця в концентрації целюлози, яка на 50% вища у більшій за розмірами частинки фракції (до 600 мк) [17].

Беручи до уваги всі вищезазначені переваги, цілком закономірно постає питання: чому й досі не налагоджено широке промислове виробництво лігніноцелюлозного етанолу?

Для виготовлення та впровадження в індустріальне виробництво лігніноцелюлозного етанолу однією з основних складностей є оптимізація методів ферментації та метаболічної інженерії. Етанол виробляють із цукрової тростини і матеріалів, які містять крохмаль. Конверсія крохмалю в етанол передбачує етап доведення крохмалю до розчинного стану й етап гідролізу до глюкози, яка легко зброджує до етанолу. Хоча є подібність між процесами перетворень крохмалю і лігніноцелюлози, однак техніко-економічні труднощі, пов'язані з лігніноцелюлозним процесом, досить суттєві. Є декілька способів перетворення лігніноцелюлози на етанол, та незалежно від обраного способу, існують такі особливості процесу:

- ◆ ефективна деполімеризація целюлози і геміцелюлози до розчинних цукрів;
- ◆ ефективна ферментація змішаного цукрового гідролізату, що містить гексози і пентози та сполуки, які пригнічують бродіння;
- ◆ складна інтеграція процесу із забезпеченням мінімальних витрат енергії;
- ◆ економічно ефективно використання лігніну.

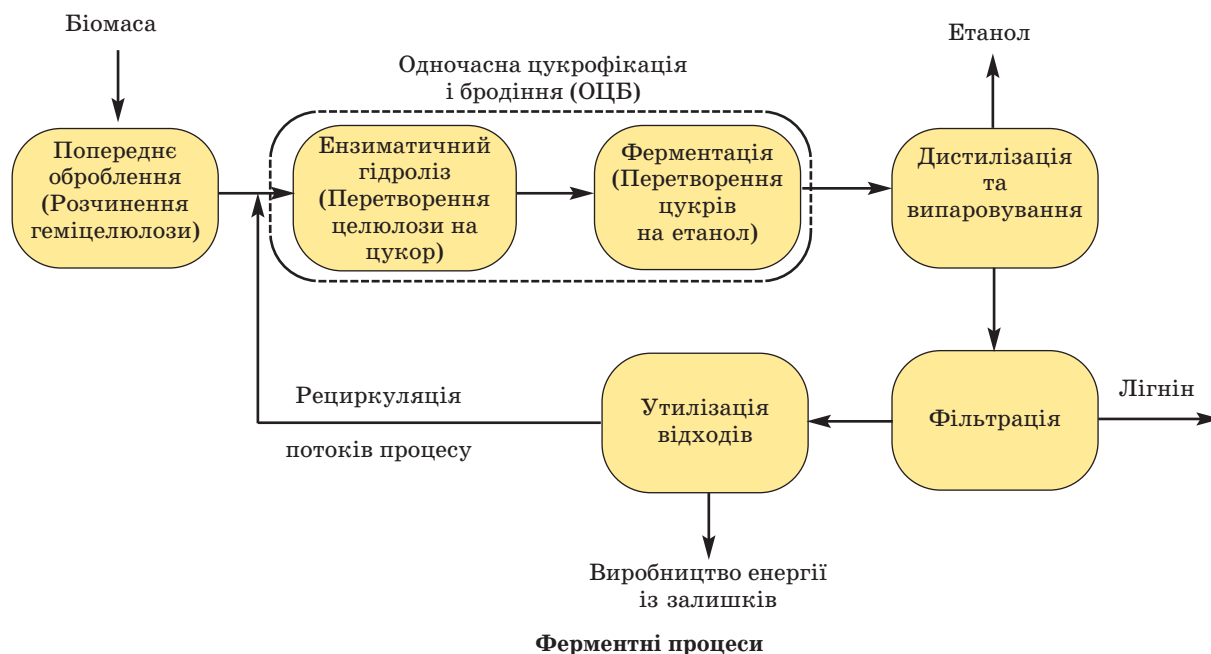
Першим кроком до одержання етанолу із рослинної біомаси є подрібнення та попереднє оброблення. Найперспективнішими технологіями є ферментні процеси (рисунок) [12]. Геміцелюлоза і целюлозні полімери гідролізуються ензимами або кислотами для вивільнення мономерних цукрів. Після попереднього оброблення та ферментного гідролізу цукри ферментуються бактеріями, дріжджами або іншими грибами, однак ферментний гідроліз і ферментація можуть бути проведені комбіновано, у процесі так званої одночасної цукрофікації і бродіння. Після остаточного очищення шляхом дистиляції етанол можна використовувати як паливо у чистому вигляді або в суміші з бензином.

Лігнін, залишкову тверду частину біомаси, можна використовувати як тверде паливо для забезпечення теплом і електроенергією процесу цукрофікації та бродіння або зберігати як цінний додатковий продукт, для перероблення якого розробляють нові технології, що можуть покласти початок новим галузям промислової хімії.

Етап перетворення біомаси на цукри

Процес біодеградації лігніноцелюлоз уперше було описано в літературі близько 40 років тому. Показано, що ензимна конверсія без утворення побічних продуктів, які пригнічують процес, залежить від типу субстрату. Ензимокаталізоване перетворення целюлози на глюкозу без попереднього оброблення біомаси відбувається повільніше. Цей процес необхідний задля досягнення високого виходу кінцевого продукту і комерційної вигідності [18]. Метою попереднього оброблення є збільшення розмірів пор і зменшення ступеня кристалічності целюлози. У процесі попереднього оброблення кислотним каталізатором гідролізуються геміцелюлозні шари, тимчасом як у разі оброблення лугом в основному видаляється частина лігніну. Попереднє оброблення необхідне, щоб оголити целюлозні волокна, зробити їх доступнішими для ферментів. Ефективна підготовка біомаси може значно зменшити вимоги до якості ензимів, які звичайно становлять істотну частину вартості виробництва.

У США за результатами широких досліджень, під час яких одну й ту саму партію кукурудзяної сировини було попередньо оброблено різними методами (розведеною кислотою або з розривом волокон аміаком), а потім стандартними методами визначено



якість, вихід цукрів у продукті виявився практично однаковим [19]. Після попереднього оброблення й гідролізу вихід цукру становить 90% і вище, що свідчить про легке розкладання кукурудзяної сировини. У разі оброблення кукурудзяних стрижнів водяним паром з невеликим вмістом SO_2 вихід продукту був близьким до теоретичних розрахунків. Оброблення паром без каталізатора також давало 90%-й вихід глюкози [16].

У таких країнах, як Швеція, Канада і США основна частина доступної біомаси представлена м'якою деревиною, яка важче піддається гідролізу порівняно з кукурудзяною сировиною. Для м'якої деревини оброблення паром з додаванням кислотного каталізатора, наприклад H_2SO_4 або SO_2 , є необхідним для досягнення високого виходу цукрів. Оброблення паром сировини з додаванням SO_2 до сировини робить її такою, що легко гідролізується і ферментується, тоді як замочування у розведеній кислоті ускладнює ферментацію внаслідок утворення інгібіторних сполук. Застосовуючи стандартну технологію, можна одержати 300 л етанолу з метричної тонни біомаси, що становить близько 70% від теоретичного виходу із гексозних цукрів [12].

Оброблення паром із додаванням каталізатора для гідролізу і з поліпшеною ферментацією — це технологія, що є найближчою до комерціалізації. Її було всебічно протестовано на малогабаритній тестовій установці Jogen на демонстраційних заводах

у Канаді, Франції та Швеції. Цю установку буде також застосовано у Саламанці (Іспанія) на заводі компанії Абенгоа [12].

Найбільш імовірно, що єдиного способу попереднього оброблення біомаси не буде, різні типи сировини потребуватимуть і різних способів його проведення. Наразі такі методи, як аміачний розрив волокон, або оброблення розведеною кислотою чи гарячою водою, вважаються придатнішими для відходів сільськогосподарства, тимчасом як оброблення паром сприяє високому виходу цукрів як із відходів лісової промисловості, так і з сільськогосподарських залишків. Виходу глюкози понад 90%, а ксилози понад 80% було досягнуто після ензимного гідролізу як із додаванням кислотного каталізатора, так і без нього [20–22].

Кислотно-каталізована попередня обробка забезпечує переважно розчинність геміцелюлозної фракції. Рідина для оброблення м'якої деревини містить в основному манозу з поліпшеною розчинністю, а також невелику кількість ксилози, арабінози, галактози і глюкози. Тверда фаза містить лігнін і целюлозу, яка підлягає ензимному гідролізу. Максимальна активність для більшості целюлаз, одержаних із грибів і бета-глюкозидаз, спостерігається при 50 °C і рН 4–5 [23]. Однак оптимальні умови залежать від часу гідролізу і джерела ензимів.

Целюлази належать до двох груп ензимів, відомих як ендоглюконази і целобіогідролази. Ендоглюконази розривають целюлозний ланцюг, створюючи вільні кінці,

з яких целобіогідролази зрізають молекули глюкози або целобіози. Третій необхідний тип ензимів — це бета-глюкозидази, які гідролізують целобіозу на дві молекули глюкози. За відсутності бета-глюкозидази целобіоза інгібує утворення кінцевого продукту. Більш того, показано, що речовини, які утворюються під час попереднього оброблення, можуть справляти небажані ефекти на ензимний гідроліз, який значно поліпшується у разі заміни на цьому етапі рідкої фракції на буферний розчин. При цьому зменшується інгібування кінцевого продукту за рахунок видалення інгібіторних сполук [23].

З ініціативи Департаменту енергетики США дві компанії — Genencor International та Novozymes, Inc. одержали по 17 млн. доларів кожна для досліджень з метою зменшення вартості ензимів у 10 разів [12]. Учені активно працюють у цьому напрямі, однак вартість виробництва ензимів усе ще є дуже високою і потребує подальшого зниження.

Етап ферментації цукрів до етанолу

На відміну від процесу виробництва етанолу з цукру і крохмалю, лігніноцелюлозне виробництво базується на ферментації змішаних цукрів у присутності інгібуючих сполук: органічних кислот з низькою молекулярною масою, похідних фурану і неорганічних сполук, що утворились під час попереднього оброблення і/або гідролізу сировини. Лігніноцелюлозні матеріали, особливо тверда деревина і сільськогосподарські сировинні залишки, можуть містити до 5–20% пентозних цукрів ксилози і арабінози. Ці цукри не ферментуються до етанолу промисловими мікроорганізмами, з яких найуживанішими є дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*. Ксилоза — це пентозний цукор, що трапляється частіше, ніж арабіноза. Вміст арабінози у кукурудзяних качанах і пшеничній сировині може становити до 14–15% [24]. Тому основні зусилля дослідників були спрямовані на пошук ефективних мікроорганізмів саме для ферментації ксилози.

Мікроорганізми, які ферментують ксилозу, є серед бактерій, дріжджів і волокнистих грибів. Анаеробні бактерії ферментують пентози, але вони пригнічуються вже за низьких концентрацій цукрів і етанолу. Окрім того етанольна ферментація відбувається зі значним утворенням побічних продуктів, що зменшує вихід етанолу. При-

родні дріжджі, особливо *Pichia stipitis* CBS 6054, ферментують ксилозу до етанолу з досить високими виходом і продуктивністю, однак ці дріжджі інгібуються сполуками, які утворюються під час попереднього оброблення і гідролізу лігніноцелюлозного матеріалу. Волокнисті гриби стійкі до інгібіторів, але діють надто повільно як для комерційно-промислового процесу. Тому зусилля були сконцентровані в основному на одержанні рекомбінантних типів бактерій і дріжджів, які були б придатні для промислової ферментації лігніноцелюлози.

S. cerevisiae і *Klebsiella oxytoca*, що ферментують пентозу, було одержано шляхом уведення із *Zymomonas mobilis* генів, які контролюють вироблення етанолу. Водночас перший різновид *S. cerevisiae*, що ферментує ксилозу, було отримано через уведення генів відповідних ензимів із *P. stipitis* [12].

Інші ксилозоферментуючі різновиди *S. cerevisiae* одержали шляхом уведення генів, які кодують ізомеразу ксилози, із бактерії *Thermus thermophilus* і анаеробного гриба *Piromyces sp.* Для *S. cerevisiae*, що використовують ксилозу, підвищення виходу етанолу із ксилози також потребує метаболічного конструювання для посилення попереднього утворення ксилози. Це було продемонстровано в установці з одночасною цукрофікацією і бродінням кукурудзяної сировини, коли глюкоза і ксилоза ферментувались одночасно рекомбінантними різновидами бактерій і грибів зі збільшеним потоком вуглецю. Нещодавно методами генетичної інженерії було створено рекомбінантний різновид бактерії *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* для поліпшення етанольної ферментації [25].

Оскільки звичайні дріжджі *S. cerevisiae* можуть ферментувати арабінозу в етанол тільки у збагачених середовищах, їх було змінено шляхом уведення як бактеріальних, так і грибних генів, що кодують ензими, які метаболізують арабінозу. Функціональний шлях метаболізму арабінози було нещодавно інтегровано в диплоїдний ксилозоферментуючий різновид *S. cerevisiae* ТМВ 3400, для якого було продемонстровано спільне використання ксилози та арабінози [12].

На додаток до здатності ферментувати як гексозні, так і пентозні цукри, ферментуючі мікроорганізми мають робити це у присутності інгібуючих сполук, таких як слабкі кислоти, похідні фурану [26]. Детоксифікація за допомогою хімічних або фізичних методів перед ферментацією зменшує концентрацію інгібіторів і покращує характе-

ристики процесу ферментації. Оброблення $\text{Ca}(\text{OH})_2$ та іонообмінна обробка значно поліпшують здатність до ферментації. Однак $\text{Ca}(\text{OH})_2$ навряд чи буде придатний до застосування у великих промислових установках з виробництва етанолу, оскільки осад солей кальцію може забруднювати колонки дистиляції, випаровувачі та теплообмінники [27].

Під час етанольної дріжджової ферментації біологічна детоксикація відбувається у процесі відновлення карбонільних сполук до відповідних спиртів, які є слабкішими інгібіторами для дріжджів. Цей процес регулюється швидкістю завантаження гідролізату відповідно до здатності інгібіторів дріжджів до конверсії. У цих випадках вихід ферментації залежатиме від концентрації інгібітора, конверсійної здатності дріжджів і якості контролю за процесом [22]. Слід зазначити, що літературні джерела не завжди чітко і повно повідомляють про умови ферментації, сировинні матеріали, умови попереднього оброблення та гідролізу.

Продовжуються численні дослідження з підвищення ефективності та якості ферментів. Винесення нових ферментів на клітинну поверхню дріжджів є дуже дієвим методом для розроблення ефективних цілоклітинних біокатализаторів, оскільки долається проблема дифузії субстрату та продукту. Розроблено різноманітні нові методи для винесення нових ферментів із високою молекулярною масою та застосування їх у практично важливих реакціях під час виробництва біопалива з біомаси [28, 29]. Пошуки в цьому напрямі тривають. Їхньою головною метою є здешевлення ферментативного процесу бродіння.

Від досліджень до комерційного процесу

Оцінка вартості виробництва етанолу із целюлозної сировини суттєво варіює — від 0,28 до 1,0 дол. США за літр, що було нещодавно наведено в техніко-економічних оцінках різних груп дослідників [12]. Однак більшість оцінок вартості зроблено під час виробництва в лабораторних масштабах і деякою мірою виходячи з даних виробничо-промислового випробування для окремих етапів процесу. Тому таке оцінювання слід сприймати обережно. Вартість сировини, яка істотно відрізняється у різних дослідників (22–61 дол. США за метричну тонну сухої речовини), і капітальні витрати, що залежать від масштабів виробництва, становлять найбільшу частину повної вартості

виробництва. Вартість гідролізу, особливо у разі ензимного процесу, також є значною частиною загальних витрат.

Для високого виходу етанолу потрібен повний гідроліз як целюлози, так і геміцелюлози з мінімумом деградації цукрів, а також ефективна ферментація усіх цукрів у біомасі. У найближчій перспективі побічні продукти, ймовірно, використовуватимуться для виробництва палива, тепла і електроенергії, а згодом технологія біоетанолу створить основу для відтворення виробництва комерційних хімікатів. Це досягатиметься поєднанням високих концентрацій твердих речовин з інтеграцією етапів енерговитратних процесів, таких як попередня обробка, дистиляція, випаровування і сушіння, обмеження витрат чистої води та зменшення викидів.

Інтеграція зменшує капітальні витрати. У процесі з роздільними гідролізом і бродінням целюлозу спочатку гідролізують до глюкози, а потім глюкоза ферментується в етанол. Основна перевага цього процесу в тому, що як гідроліз, так і ферментація відбуваються за оптимальних умов. З другого боку, недолік полягає в тому, що целюлозолітичні ензими інгібуються кінцевими продуктами і тому швидкість гідролізу прогресивно зменшується під час накопичення глюкози і целобіози. Інгібування продуктом зменшується за одночасної цукрофікації і бродіння целюлози. У цьому процесі ферментуючі мікроорганізми негайно поглинають цукри, які вивільнилися. Більш того, ферментація може зменшувати інгібування ензимів шляхом конверсії деяких токсичних сполук, що присутні в гідролізаті. Це підвищує загальну продуктивність виробництва етанолу, його концентрацію та кінцевий вихід [12].

Нещодавно технологію одночасної цукрофікації і бродіння було успішно застосовано для ферментації гексозних і пентозних цукрів. При цьому ензимний гідроліз постійно вивільняє гексозні цукри, що збільшує швидкість гліколізу, і таким чином пентозні цукри ферментуються швидше і з більшим відсотком виходу [25].

Подальшої інтеграції процесів може бути досягнуто шляхом поєднання гідролізу і бродіння. Таке біовиробництво використовувало б окремі мікроорганізми або їх суміш для одержання всіх необхідних ензимів, а отже і для ферментації всіх цукрів [30]. Однак такі мікроорганізми на цей час ще не створено, потрібні додаткові дослідження у цьому напрямі.

На сьогодні демонстраційна установка корпорації Jogen є єдиною працюючою установкою для виробництва біоетанолу із лігніноцелюлози з використанням процесу ензиматичного гідролізу. Вона може переробляти за день до 40 т пшеничної, вівсяної та ячмінної соломи і розрахована на виробництво до 3 млн. л целюлозного етанолу на рік. Компанія Abengoa Bioenergy буде випробувальний завод у Йорку (США) для перероблення залишкового крохмалю, целюлози й геміцелюлози, в основному з кукурудзяної сировини, на біоетанол і для виготовлення кормів з високим вмістом білка. У Саламанці та сама компанія побудувала демонстраційну установку, інтегровану із заводом, що виробляє етанол із зерна, потужністю до 195 млн. л на рік. У демонстраційній установці вироблятиметься додатково 5 млн. л етанолу на рік із целюлози, переважно із пшеничної сировини. У середині 2004 р. у Швеції уведено в дію повністю інтегровану дослідну установку для виробництва етанолу з м'якої деревини. Вона об'єднує двоетапний гідроліз розведеною кислотою і ензиматичний процес, переробляючи максимум 2 т деревини на день.

Перехід від експериментального і демонстраційного виробництва лігніноцелюлозного етанолу до комерційного повномасштабного потребує подальшого зменшення вартості виробництва. Одним із шляхів досягнення цієї мети є об'єднання виробництва етанолу з генерацією тепла і електроенергії або з переробленням паперу. Це може зменшити вартість етанолу на 20% в умовах Швеції і є основою її стратегії у виробництві біопалива з целюлози. Такі висновки було зроблено після вивчення перспектив виробництва етанолу і електроенергії з м'якої деревини у Каліфорнії. Іншою можливістю є об'єднання виробництва етанолу із целюлози з виробництвом етанолу з крохмалю за повного використання залишків рослин. У майбутньому, на нашу думку, такі інтеграційні підходи використовуватимуться у першому комерційно успішному виробництві лігніноцелюлозного паливного етанолу в промислових масштабах. Втілення виробництва лігніноцелюлозного етанолу в завершену промислову технологію потребує нових досліджень і розробок.

В Україні робляться перші спроби виготовлення біодизеля з ріпаку. Починаючи з 2007 р. сформовано цільову комплексну програму наукових досліджень НАН України «Біомаса як паливна сировина». За не уточненими даними і різними оцінками,

в Україні є 2 невеликих заводи і близько 40 напівкустарних виробництв, які у 2006 р. виробили до 20 тис. т біодизеля [31].

Для виготовлення біоетанолу пропонується використовувати кукурудзу, цукровий буряк та інші культури (сорго, сориз). Ефективність перетворення крохмалю зерна пшениці чи кукурудзи на біоетанол значною мірою залежить від генетичних особливостей сортів та гібридів.

Кукурудза, як провідна культура, здатна забезпечити урожай зерна понад 100 ц/га практично в усіх зонах України. Після картоплі це друга за вмістом крохмалю культура і більш технологічна для виготовлення біоетанолу як палива.

Крохмаль — головний полісахарид, що відіграє роль запасної речовини, вміст якого в зерні кукурудзи становить 60–75% [32]. Кількість крохмалю та його якісний склад залежно від ботанічної групи варіює в широких межах. Найбільше його в зерні крохмалистої кукурудзи (56–71%). Крохмаль звичайної зубоподібної і кременистої кукурудзи містить до 27–28% амілози і 72–73% амілопектину. У процесі формування зернівки на перших етапах у великій кількості накопичується амілопектин, а починаючи з фази молочної стиглості в крохмалі збільшується відносна кількість амілози. Крохмаль мутантів за геном *waxy* (воскоподібна кукурудза) містить лише амілопектин, амілозу не виявлено протягом усього періоду формування і дозрівання зернівки.

У кукурудзи відомо понад 60 мутантних генів, що контролюють біохімічні властивості зерна, вміст крохмалю, амілози, цукрів, вуглеводів [33]. Під час взаємодії гена *waxy* з іншими мутантними генами різко змінюється співвідношення вмісту крохмалю, амілози й амілопектину. Це важливо для технології виготовлення біоетанолу.

Для реалізації програм виготовлення біоетанолу важливим є створення спеціальних сортів та гібридів рослин з високим вмістом крохмалю та найефективнішим співвідношенням його компонентів.

Кукурудза є головним джерелом кормових, продовольчих та енергетичних ресурсів, предметом торгівлі на внутрішньому і зовнішньому ринках.

В Україні за період 1980–2007 рр. академіком НАН України В. В. Моргуном та очолюваним ним колективом Інституту фізіології рослин і генетики НАН України створено та занесено до Державного реєстру сортів рослин України 70 гібридів кукурудзи, які в різні роки висівались на площі до

5,5 млн. га. Серед них 16 гібридів створено в останні 4 роки. Це гібриди різних груп стиглості: Поліський 177 МВ, Переяслівський 130 СВ, Суботівський 190 СВ, Явір 180 СВ, Чигиринський 267 СВ, Корсунський 297 МВ, Орлик 330 МВ, Богун, Титан 220 СВ, Нептун СВ, Комета МВ, Аметист та інші. Гібриди Планета 180 СВ, Комета МВ є національними стандартами [34].

Продуктивність нових гібридів кукурудзи селекції ІФРГ НАН України залежно від групи стиглості в Державному сортовипробуванні становить 80–150 ц/га. Відомо, що гібриди вітчизняної селекції краще адаптовані до місцевих умов вирощування. Завезені іноземні гібриди, як свідчить виробничий досвід, значно гірше пристосовані до наших кліматичних умов та розповсюджених шкідників і хвороб.

Нами проведено аналіз вмісту крохмалю в зерні батьківських форм з метою їх використання у перспективі для створення гібридів спеціального призначення та районованих гібридів кукурудзи селекції Інституту. Серед наявного у нас генофонду виявлено самозапилені лінії та гібриди з підвищеним вмістом крохмалю (табл. 1).

Таблиця 1. Вміст крохмалю у зерні самозаплених ліній та гібридів кукурудзи (F1) селекції Інституту фізіології рослин і генетики НАН України

Зразки	Вміст крохмалю, %
Інбредні лінії	71,3–74,4
Прості гібриди	70,9–74,8
Трилінійні гібриди	72,9–75,9
НСР _{0,95}	2,18

Проаналізовано 54 зразки, серед ліній найвищий вміст крохмалю виявлено у зерні лінії Л 250 С — 74,4%, у простого гібриду Вулкан — 74,8%, у зерні трилінійних районованих гібридів Титан 220 СВ — 74,0%, Явір 180 СВ — 74,7%, Переяслівський 230 СВ — 75,2%, Чигиринський 267 СВ — 75,9%. Однак слід зазначити, що спрямовану селекцію на високий вміст не проводили, про що свідчить незначна мінливість цієї ознаки.

У колекції Інституту є зразки кукурудзи з воскоподібним типом ендосперму, крохмаль яких містить лише амілопектин. Створення гібридів з найефективнішим співвідношенням компонентів крохмалю — амілози й амілопектину та їх використання є суттєвим у технології виготовлення біоетанолу.

Кукурудза як культура є добрим джерелом лігніноцелюлозної сировини. Визначено урожай нормалізованої сухої речовини гібридів різних груп стиглості, який у 2007 р. становив 23,4–40,1 т/га. (табл. 2).

Таблиця 2. Урожай зеленої маси та сухої речовини гібридів (F1) кукурудзи селекції Інституту фізіології рослин і генетики НАН України

Показники	2006	2007	НСР _{0,95}
Урожай зеленої маси, т/га	49,1–117,3	28,9–57,8	3,9; 3,3
Вихід сухої речовини, %	27,7–45,3	39,4–66,6	2,9; 5,2
Урожай нормалізованої сухої речовини, т/га	19,0–33,5	23,4–40,1	2,6; 5,2
Проаналізовано гібридів	17	16	–

Такі гібриди, як Метеор 317 МВ, Башкировець, Аметист, здатні забезпечити урожай зеленої маси 78,3–117,3 т/га.

Таким чином, селекціонери уже зараз можуть запропонувати гібриди кукурудзи для виготовлення біоетанолу. Однак економісти мають підрахувати, яке паливо буде найбільш конкурентоспроможним для України і з чого його виробляти, а селекціонери створюватимуть такі гібриди, які будуть затребувані виробниками.

Значним резервом поновлюваної сировини для виготовлення альтернативних джерел енергії, зокрема біоетанолу та біогазу, є залишки листостеблової маси після збирання зернової кукурудзи. Енергетична продуктивність кукурудзи є високою — на рівні з деревиною [35]. На нашу думку, в Україні потрібно опановувати технологію виготовлення лігніноцелюлозного біоетанолу з листостеблових залишків кукурудзи, стрижнів качанів, соломи пшениці, ячменю, вівса, ріпаку, соняшнику та інших культур.

Стосовно цукрового буряку, то як вважають спеціалісти в цій галузі, до 2010 р. Україна може відвести під виробництво етанолу 225 тис. га посівів цукрових буряків поетапно, починаючи з додаткових 50 тис. га на рік. Використання жомово-мелясних суспензій та дифузійного соку буряків може суттєво вплинути на зниження собівартості цукру та біоетанолу [36].

На міжнародному форумі з біоенергетики, що відбувся в Україні у 2007 р. за участю Німеччини — визнаного в Європі лідера з виробництва біопалива, відзначалось, що Україна, як потенційний виробник біопалива,

має багато переваг. Це — наявність земельних ресурсів, сприятливі агрокліматичні умови для виробництва зернових і олійних культур, достатня кількість сировини (ріпак, соя, кукурудза, соняшник, пшениця), спиртові та олійнопереробні заводи. Разом з тим наголошувалося, що існуючі заводи не оснащені потужним сучасним обладнанням, нарощування виробництва сировини не контрольоване, виробництво несертифікованого біопалива для власних потреб є стихійним, малопотужним, країна перетворюється на «сировинний додаток» для забезпечення біопаливних потреб інших країн [31].

За розрахунками спеціалістів конкурентоспроможність біопалива залежить від багатьох чинників і передусім від урожайності біоенергетичних культур, що тісно пов'язана з належною агротехнікою, кліматичними умовами, забезпеченням добривами, засобами захисту рослин тощо, а також від ціни на нафту. У Німеччині Федеральне міністерство продовольства, сільського господарства і захисту прав виробників надає всебічну підтримку як фермерам, які вирощують біоенергетичні культури, так і виробникам палива, чого немає в Україні. З другого боку, субсидії, які надаються у США [11], спонукають американських фермерів скорочувати площі під іншими продовольчими культурами для розширення виробництва кукурудзи з метою перероблення її на етанол, а це призводить до росту цін на продукти харчування та зменшення обсягів їх виробництва.

Існує альтернативна думка, що виготовлення біопалива із зерна не має майбутнього, оскільки зумовить зниження обсягів виробництва продуктів харчування, їх подорожчання та спричинить інтенсивне виснаження родючості ґрунтів. Це вагомий аргумент на користь використання лігніноцелюлозної сировини.

Отже, аналіз досліджень з проблеми виробництва та впровадження альтернативних поновлюваних джерел енергії свідчить, що вчені багатьох країн світу активно пра-

цюють над вирішенням цієї проблеми. Кожна країна має самостійно вирішувати, з якої наявної сировини виготовляти біопаливо. В Україні ведеться широка полеміка із цього приводу, висловлюються різні думки і пропозиції. Реально уже зараз виробляти біопаливо із зерна пшениці, кукурудзи, соняшнику, сої, ріпаку. Однак економічні розрахунки свідчать, що для України таке біопаливо не є конкурентоспроможним [37].

Насіннєві та біотехнологічні іноземні компанії, які працюють на ринку України, вбачають нові великі можливості у створенні енергетичних рослин, стійких до комах і пестицидів, зокрема генетично модифікованої кукурудзи, призначеної для виробництва етанолу. Так, компанія «Сингента» сподівається у 2008 р. розпочати продаж кукурудзи, зерно якої вже містить фермент, що його треба було б додавати на спиртозаводі [38].

В Україні є понад 1,5 млн. га земель, непридатних для сільськогосподарського використання, які потрібно освоювати. На цій території можна було б вирощувати енергетичні культури, що не накопичують важких металів у листостебловій масі, з метою використання як лігніноцелюлозної сировини для виробництва біоетанолу.

На сьогодні проблема поновлюваних джерел енергії відкриває нові перспективи у використанні земельних ресурсів. Унікальність землі з фотосинтезуючими рослинами в тому, що її ресурси за умов правильного використання невичерпні й безмежні. Той, хто буде володіти ключем до родючості землі, зможе максимально забезпечити продовольчу і енергетичну безпеку країни.

Виконання програми «Біопаливо» потребує розроблення в Україні власної стратегії розвитку біоенергетики, враховуючи наукові напрацювання та досвід передових країн світу. Раціональне освоєння нових технологій виготовлення біопалива з різних видів сировини, у тому числі залишків аграрного та деревообробного виробництва, будівництва та переоснащення переробних заводів стають вимогами нового часу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Gray K. A., Zhao L., Emptage M. Bioethanol // *Curr. Opin. Chem. Biol.* — 2006. — V. 10. — P. 1–6.
2. Herrera S. Bonkers about biofuels // *Nat. Biotechnol.* — 2006. — V. 24. — P. 755–760.
3. Pradeep V., Sharma R. Use of HOT EGR for NO_x control in a compression ignition engine fueled with bio-diesel from *Jatropha* oil // *Renewable Energy.* — 2007. — V. 32. — P. 1136–1154.
4. Kalita D. Hydrocarbon plant — New source of energy for future // *Science Direct, Renewable and Sustainable Energy Reviews.* — 2006. — V. 31. — P. 3–13.
5. Dewil R., Baeyens J., Appels L. Enhancing the use of waste activated sludge as bio-fuel

- through selectively reducing its heavy metal content // *J. Hazard Mater.* — 2007. — V. 144. — P. 703–707.
6. *Carraretto C., Macor A., Stoppato A., Tonon S.* Biodiesel as alternative fuel: Experimental analysis and energetic evaluations // *Energy.* — 2004. — V. 29. — P. 2195–2211.
 7. *Hancsok J., Krar M., Magyar S.* Investigation of the production of high cetane number bio gas oil from pre-hydrogenated vegetable oils over Pt/HZSM22. Al₂O₃ // *Microporous and Mesoporous Materials.* — 2007. — V. 101. — P. 148–152.
 8. *Rakopoulos C., Rakopoulos D., Hountalas D. et al.* Performance and emissions of bus engine using blends of diesel fuel with bio-diesel of sunflower or cottonseed oils derived from Greek feedstock // *Fuel.* — 2007. — P. 2–10.
 9. *Ramadhas A., Jayaraj S., Muraleedharan C.* Use of vegetable oils as I.C. Engine fuels — A review // *Renewable Energy.* — 2004. — V. 29. — P. 727–742.
 10. *Рибалка О., Соколов В.* Одержання біоетанолу із зернових виглядає привабливішим, ніж дизельного пального із соняшнику й ріпаку // *Зерно і хліб.* — 2006. — №4. — С. 22–24.
 11. *The Columbus Dispatch.* США повинні імпортувати етанол з Бразилії // *Пропозиція.* — 2007. — № 9.
 12. *Hahn-Yagerdal B., Galbe M., Gorwa-Grauslund M. F. et al.* Bio-ethanol—the fuel of tomorrow from the residues of today // *TRENDS in Biotechnology.* — 2006. — V. 24, N12. — P. 549–556.
 13. *Ni M., Leung D. Y., Leung M. K.* A review on reforming bio-ethanol for hydrogen production // *International Journal of Hydrogen production.* — 2007. — P. 2–10.
 14. *Levin D. B., Zhu H., Beland M. et al.* Potential for hydrogen and methane production from biomass residues in Canada // *Bioresource Technology.* — 2007. — V. 98. — P. 654–660.
 15. *Hoskinson R. L., Karlen D. L., Birrell S. J. et al.* Engineering, nutrient removal, and feedstock conversion evaluations of four corn stover harvest scenarios // *Biomass and Bioenergy.* — 2007. — V. 31. — P. 126–136.
 16. *Ohgren K., Rudolf A., Galbe M., Zacchi G.* Fuel ethanol production from steam-pretreated corn stover using SSF at higher dry matter content // *Ibid.* — 2006. — V. 30. — P. 863–869.
 17. *Bridgeman T. G., Darvell L. I., Jones J. M. et al.* Influence of particle size the analytical and chemical properties of two energy crops // *Fuel.* — 2007. — V. 86. — P. 60–72.
 18. *Mosier N., Wyman C., Dale B. et al.* Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass // *Bioresour. Technol.* — 2005. — V. 96. — P. 1986–1993.
 19. *Wyman C. E., Spindler D. D.* Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies // *Ibid.* — 2005. — V. 96. — P. 1959–1966.
 20. *Ohgren K., Bura R., Saddler J., Zacchi G.* Optimization of steam pretreatment of SO₂ impregnated corn stover for fuel production // *Appl. Biochem. Biotechnol.* — 2005. — V. 121. — P. 1055–1067.
 21. *Sassner P., Galbe M., Zacchi G.* Bioethanol production based on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated *Salix* at high dry-matter content // *Enzyme Microb. Technol.* — 2006. — V. 39. — P. 756–762.
 22. *Taherzadeh M. J., Liden S. S., Gustafson L., Niklasson C.* On-line control of fed-batch fermentation of dilute-acid hydrolyzates // *Biotechnol. Bioeng.* — 2002. — V. 69. — P. 330–338.
 23. *Tengborg C., Galbe M., Zacchi G.* Influence of enzyme loading and physical parameters on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood // *Biotechnol. Prog.* — 2001. — V. 17. — P. 110–117.
 24. *Jeffries T. W.* Engineering yeasts for xylose metabolism // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 2006. — V. 17. — P. 1–7.
 25. *Ohgren K., Bengtsson O., Gorwa-Grauslund M. F. et al.* Simultaneous saccharification and cofermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fibre content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB 3400 // *J. Biotechnol.* — 2006. — V. 126, N4. — P. 488–498.
 26. *Palmqvist E., Hahn-Yagerdal B.* Fermentation of ligninocellulosic hydrolyzates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition // *Bioresour. Technol.* — 2000. — V. 74. — P. 25–33.
 27. *Schell D., Riley C. J., Dowe N. et al.* A bioethanol process development unit: initial operating experiences and results with a corn fibre feedstock // *Bioresour. Technol.* — 2004. — V. 91. — P. 179–188.
 28. *Freng J., Qin Yu Hong, Green Alex E. S.* Analytical model of corn cob Pyroprobe-FTIR data // *Biomass and Bioenergy.* — 2006. — V. 30. — P. 486–492.
 29. *Kondo A., Fukuda H.* Production of bio-fuels from biomass by cell surface engineered yeast strains // *J. Biotechnol.* — 2007. — V. 131. — S. 23–31.
 30. *Lynd L. R., Weimer P. J., Pretorius I. S.* Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 2005. — V. 16. — P. 577–583.
 31. *Стерний О.* Дас ист фантастиш? О биотопливе с немецким акцентом // *Зерно.* — 2007. — №7. — С. 118–119.

32. Палий А. Ф. Генетические аспекты улучшения качества кукурузы. — Кишинев: Штиинца, 1989. — 175 с.
33. Дорофеев В. И., Фадеева Т. С., Шмараев Г. Е. Генетика культурных растений: кукуруза, рис, просо, овес. — Л.: Агропромиздат, 1988. — 272 с.
34. Моргун В. В., Ларченко К. А., Гаврилюк В. М., Хроменко В. О. Продуктивність нових гібридів кукурудзи залежно від тривалості вегетаційного періоду та природно-кліматичних умов // Насінництво. — 2007. — №5. — С. 20–23.
35. Лакемєєр Е., Штрубенхофф Х. Виробництво біоенергії в Україні: конкурентоспроможність сільськогосподарських культур та іншої сільськогосподарської і лісгосподарської сировини // Пропозиція. — 2007. — №149. — С. 30–36.
36. Роїк М. Етанол з бурякового поля // Сільські вісті. — 2007, 14 вересня.
37. Михайлов Ю. Друга кукурудзяна авантюра // Пропозиція. — 2007. — №5. — С. 20–22.
38. Поллак Е. Створення рослин для виробництва палива // Там само. — 2007. — №3. — С. 12–13.

БИОЭТАНОЛ КАК АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ ВОЗОБНОВЛЯЕМЫЙ ИСТОЧНИК ЭНЕРГИИ

Е. А. Ларченко¹, В. В. Моргун²

¹ Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Київ

² Інститут клітинної біології і генетическої інженерії НАН України, Київ

Рассмотрена проблема альтернативных источников энергии. Основное внимание уделено производству биотоплива, в частности биоэтанола, в Украине и мире. Изложена технология производства биоэтанола из лигноцеллюлозного сырья. Оцениваются перспективы производства и использования биотоплива.

Ключевые слова: альтернативные источники энергии, биоэтанол, гидролиз, ферментация, крахмал, сахар, кукуруза.

BIOETHANOL AS ALTERNATIVE RENEWABLE SOURCE OF ENERGY

K. A. Larchenko¹, V. V. Morgun²

¹ Institute of Plant Physiology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

² Institute Cell Biology and Genetic Engineering of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

The article reviews the issue of alternative energy sources. Principal attention is given to biofuel production, in particular to bioethanol in Ukraine and in the world. The «know-how» of bioethanol production from lignocellulosic raw materials is presented. In addition, the authors evaluate future prospects of biofuel production and use.

Key words: alternative sources of energy, bioethanol, hydrolysis, fermentation, starch, sugar, maize.

УДК 759.873.088.5:661.185

МІКРОБНІ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНІ РЕЧОВИНИ: ПРОБЛЕМИ ПРОМИСЛОВОГО ВИРОБНИЦТВА

Т. П. ПИРОГ, С. В. ІГНАТЕНКО

Національний університет харчових технологій, Київ

E-mail: tapirog@usuft.kiev.ua

Наведено літературні та власні експериментальні дані авторів щодо стану і перспектив розвитку промислового виробництва мікробних поверхнево-активних речовин (ПАР). Зазначається, що висока на сьогодні собівартість мікробних ПАР зумовлена великими витратами на біосинтез і виділення цільового продукту, а також невисокою продуктивністю штамів-продуцентів. Дослідження, спрямовані на вирішення цих проблем, є ключовими й пріоритетними у біотехнології мікробних ПАР. Ефективність технологій мікробних ПАР може бути підвищена за рахунок використання як ростових субстратів промислових відходів, оптимізації умов культивування продуцентів, внесення у середовище попередників біосинтезу, розроблення рентабельних методів виділення ПАР та одержання штамів-надсинтетиків, у тому числі й рекомбінантних.

Ключові слова: поверхнево-активні речовини, технологія біосинтезу, ефективність виробництва, промислові відходи, умови культивування, мікроорганізми-продуценти, виділення цільового продукту.

Мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР) використовуються у багатьох галузях народного господарства, зокрема для підвищення нафтовидобутку, надання специфічних смакових і структурних властивостей продуктам харчування, для створення нових високоефективних форм фармацевтичних препаратів, а також у процесах біоремедіації екосистем [1–4]. Такого широкого застосування мікробні ПАР набули завдяки біодеградабельності, низькій токсичності, стабільності фізико-хімічних властивостей у широкому діапазоні рН і температури тощо [5].

Попри комерційно привабливі властивості мікробних ПАР та значні переваги їх порівняно із синтетичними аналогами, промислове виробництво цієї групи речовин в Україні дотепер не реалізовано, а факторами, що стримують впровадження технологій мікробних ПАР у світі, є високі витрати на біосинтез (сировина, енергетика), виділення та очищення цільового продукту, а також недостатньо висока продуктивність штамів-продуцентів [5, 6].

У зв'язку з цим потенційними шляхами підвищення ефективності технологій мікробних ПАР є такі:

◆ використання дешевих ростових субстратів (продуктів переробки основної сировини або відходів різних галузей промисловості);

◆ оптимізація умов культивування продуцента та пошук нових рентабельних методів виділення й очищення ПАР;

◆ одержання мутантних і рекомбінантних штамів мікроорганізмів-надсинтетиків ПАР.

На цей час дослідники активно реалізують перші два підходи, тоді як використання рекомбінантних штамів-продуцентів ПАР донедавна в контексті зниження собівартості виробництва мікробних ПАР не розглядалось.

Альтернативні субстрати для одержання мікробних поверхнево-активних речовин

Відомо, що для переважної більшості біотехнологічних процесів вартість компонентів живильного середовища становить близько 20–30% загальних витрат на виробництво [7]. У зв'язку з цим одним із шляхів зниження собівартості цільового продукту є використання ростових субстратів дешевої промислової сировини (наприклад, жирів рослинного походження), а також відходів харчової промисловості (олійно-жирової, спиртової, молочної) та сільськогосподарського сектору (крохмалевмісні речовини) [7–9].

У низці робіт [10–12] є дані щодо можливості використання жирів рослинного

походження як ефективної та дешевої сировини для синтезу ПАР. Так, соняшникова, соєва, рапсова, кукурудзяна олії можуть слугувати субстратами для синтезу рамноліпідів, софороліпідів, манозоліпідів (табл. 1) [13–15]. Проте ці сполуки є харчовою сировиною, що обмежує застосування їх у біотехнологічних процесах. Із дешевих рослинних нехарчових олій потенційними субстратами для синтезу ПАР є, наприклад, рицинова олія та олія жожоба [15].

Окрім різних рослинних олій субстратами для одержання ПАР можуть бути побічні продукти їх виробництва. Так, встановлена можливість використання відходів виробництва соєвої та соняшникової олій для синтезу рамноліпідів штамами *Pseudomonas aeruginosa* AT10 та *P. aeruginosa* LB1 [16–18, 19]. За присутності у середовищі культивування *Candida antarctica* та *C. apicola* відходів виробництва соняшникової олії кількість синтезованих гліколіпідів становила 10,5 та 13,4 г/л відповідно [20].

Промислові жиромісні відходи інших галузей, зокрема стічні води м'ясопереробної промисловості, відходи миловарного виробництва, можуть також слугувати потенційними субстратами для синтезу ПАР. Варто зауважити, що такі субстрати є доступними у необхідних кількостях та дешевими, що повністю виключає залежність виробництва ПАР від сировинної бази.

У літературі є повідомлення про використання для синтезу ПАР відходів молочної промисловості, зокрема сироватки [21, 22]. Так, під час культивування *Pseudomonas aeruginosa* BS2 на середовищі зі вмістом сирної сироватки кількість синтезованих рамноліпідів становить 0,92 г/л, що перевищує показники синтезу ПАР на синтетичних середовищах. Використання сироватки як субстрату може вирішити проблему утилізації цього відходу молочної промисловості та суттєво знизити витрати на виробництво ПАР.

Як альтернативну сировину для виробництва ПАР також застосовують крохмалевмісні відходи. Зокрема, синтез ліпопептидів *Bacillus subtilis* здійснюють на середовищах, які містять відходи картоплепереробних виробництв [23–26]. Побічний продукт виробництва борошна з маніюки є субстратом для синтезу сурфактину *Bacillus subtilis* ATCC 21332 та *B. subtilis* LB5a [27–29]. У разі використання такого субстрату кількість ліпопептидів досягає 2,2–3,0 г/л. Субстратами для виробництва ПАР можуть слугувати такі крохмалевмісні речовини, як рідкі відходи переробки рису, обробки злаків, патоки, кукурудзяного борошна.

Наші дослідження показали можливість застосування для синтезу поверхнево-активних речовин гідрофільних субстратів (етанол, гліцерол), які порівняно з гідрофобними сполуками мають такі переваги: по-перше, вони є водорозчинними і тому більш технологічними, а по-друге, ці субстрати значно дешевші.

Із забруднених нафтою зразків ґрунту і води нами було виділено нафтоокиснювальні бактерії, ідентифіковані як *Acinetobacter calcoaceticus* K-4, *Nocardia vaccinii* K-8, *Rhodococcus erythropolis* EK-1 [30], і встановлено здатність цих штамів синтезувати метаболіти з поверхнево-активними і емульгуювальними властивостями під час росту на різних гідрофобних і гідрофільних субстратах [31, 32].

Слід зазначити, що бактерії родів *Rhodococcus* і *Acinetobacter* ростуть на етанолі [33–35], проте дотепер відсутні дані про

Таблиця 1. Використання рослинних жирів для промислового отримання поверхнево-активних речовин

Субстрат	Поверхнево-активні речовини	Штам-продуцент	ПАР, г/л
Рапсова олія	Рамноліпіди	<i>Pseudomonas species</i> DSM 2874	45
Кукурудзяна олія	Софороліпіди	<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	40
Соняшникова олія	Рамноліпіди	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DS10-129	4,31
	Ліпопептиди	<i>Serratia marcescens</i>	–
Соєва олія	Рамноліпіди	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DS10-129	2,98
	Манозилеритритолліпіди	<i>Candida species</i> SY16	9,5

Примітка: «–» — дані відсутні.

синтез ними ПАР на цьому субстраті. Відомості про утворення поверхнево-активних речовин представниками роду *Nocardia* навіть на гідрофобних субстратах є дуже обмеженими [36, 37].

Результати наших досліджень свідчать, що штам *R. erythropolis* ЕК-1 під час росту на етанолі синтезує ПАР у незначних кількостях [31]. Поверхневий натяг культуральної рідини (σ) становив 50–55 мН/м, умовна концентрація ПАР (ПАР*) досягала 1,1–1,2, а концентрація ПАР — 0,4–0,43 г/л, тоді як під час росту культури на гідрофобних субстратах ці показники були значно вищими. Подальші експерименти показали, що заміна амонійного джерела азоту на нітратне у середовищі культивування *R. erythropolis* ЕК-1, підвищення концентрації етанолу до 2%, підтримання співвідношення вуглець/азот на рівні 36:1 дали змогу збільшити показники синтезу ПАР утричі.

Максимальний синтез ПАР у процесі культивування *A. calcoaceticus* К-4 на етанолі (умовна концентрація ПАР 3,6; емульгувальна активність розведеної у 50 разів культуральної рідини становить 96%) спостерігався за наявності у середовищі сечовини як джерела азоту, а також дріжджового автолізу та мікроелементів, співвідношення С/Н 60:1, і з використанням інокуляту з кінця експоненційної фази росту в концентрації 10% [32].

На сьогодні одним з найперспективніших субстратів для використання у біотехнологічних процесах є гліцерол — побічний продукт, утворюваний у великих кількостях під час виробництва біодизеля з рослинної і тваринної сировини [38]. Так, під час одержання 100 л біодизеля утворюється (як продукт трансетерифікації рослинних олій і тваринних жирів) до 10 л гліцеролу [38]. Неможливість використання в інших технологіях такої великої кількості гліцеролу є на цей час найважливішим фактором, що стримує виробництво біодизеля у світі. Одним із шляхів утилізації гліцеролу може бути застосування його як джерела вуглецю і енергії при розробленні технологій мікробного синтезу практично цінних метаболітів.

Наші експерименти довели можливість синтезу ПАР у процесі вирощування штаму *Nocardia vaccinii* К-8 на гліцеролі. Встановлено умови культивування *N. vaccinii* К-8 на середовищі з 0,5% гліцеролу, в яких показники синтезу ПАР підвищувались у кілька разів (неопубліковані дані). Так, умовна концентрація ПАР досягає значень 4,2–5,0 за наявності у середовищі іонів заліза

і дріжджового автолізу, у разі використання інокуляту, вирощеного на гліцеролі до середини експоненційної фази росту і тривалості культивування 168 год.

Ефективні й економічно обґрунтовані методи виділення та очищення поверхнево-активних речовин

Одним із найважливіших чинників, що визначає рентабельність будь-якого біотехнологічного виробництва, є метод виділення та очищення цільового продукту. Для багатьох продуктів мікробного синтезу витрати на очищення становлять близько 60% загальних витрат на виробництво. Для виділення поверхнево-активних речовин у промисловості застосовують низку традиційних методів, зокрема кислотне осадження, екстракцію органічними розчинниками, кристалізацію, осадження сульфатом амонію, центрифугування тощо [5]. За останні роки було розроблено кілька нових методів для виділення позаклітинних ПАР: ультрафільтрація, сорбція на полістирольних матрицях та активованому вугіллі, іонообмінна хроматографія (табл. 2) [39–41]. Основною перевагою цих методів є можливість організації безперервного технологічного процесу та одержання високоочищених ПАР.

Слід зазначити, що у хроматографічних методах для здійснення процесів десорбції використовують високотоксичні органічні розчинники (ацетон, метанол, хлороформ). За останні роки у промисловості почали успішно застосовувати альтернативні розчинники типу метилтретбутилового ефіру. Зокрема, таку технологію застосовують для виділення та очищення ПАР, синтезованих бактеріями роду *Rhodococcus* [42, 43]. Ці розчинники є дешевими і менш токсичними, що дає змогу суттєво скоротити витрати на фінішних стадіях виділення ПАР та мінімізувати потенційну екологічну небезпеку. Ці переваги запропонованих розчинників уможливають створення на їх основі більш конкурентоспроможних технологій.

У деяких випадках використання одного методу є недостатнім для повного виділення ПАР чи одержання високоочищених препаратів. Тому зараз широко застосовують багатоступеневі схеми, що охоплюють кілька послідовних етапів концентрування культуральної рідини (її супернатанту) та очищення ПАР від сторонніх домішок [40]. Така схема дає змогу одержувати поверхнево-активні препарати різного ступеня чистоти.

Таблиця 2. Вибір методу виділення поверхнево-активних речовин залежно від їхніх фізико-хімічних властивостей

Метод виділення	Властивості ПАР, що визначають вибір методу	Необхідне апаратурне забезпечення	Переваги методу	Джерело
Кислотне осадження	Здатність ПАР переходити у малорозчинну форму за низьких значень рН	Збірник	Низька вартість, висока ефективність виділення	[44–46]
Осадження сульфатом амонію	Здатність ПАР білкової природи за певних значень іонної сили розчину (ізоелектрична точка) переходити у малорозчинну форму	Збірник	Ефективність у разі виділення деяких груп полімерних ПАР	[47]
Екстракція органічними розчинниками	Розчинність ПАР в органічній фазі за рахунок наявності в їхній молекулі гідрофобної частини	Екстракційна установка	Ефективний метод для виділення та часткового очищення ПАР, можливість регенерації розчинника	[40, 41]
Екстракція метилтрет-бутиловим ефіром	Розчинність ПАР в органічній фазі за рахунок наявності в їхній молекулі гідрофобної частини	Екстракційна установка	Використання низькотоксичного розчинника, можливість регенерації екстрагента, низька вартість	[42, 43]
Флотація	Здатність ПАР завдяки поверхнево-активним властивостям формувати піну і переходити в неї	Спеціально сконструйовані реактори	Можливість організації безперервного процесу виділення ПАР, високий ступінь очищення ПАР	[26, 48]
Ультрафільтрація	Здатність ПАР формувати міцели, що затримуються полімерними мембранами	Ультрафільтраційний модуль, що містить полімерні пористі мембрани	Можливість проведення швидкої регенерації мембран, високий рівень чистоти одержаних препаратів	[39, 49]
Адсорбція на полістирольних матрицях	Здатність до адсорбції ПАР на полімерних носіях з наступною десорбцією органічними розчинниками	Колонки, заповнені полістирольним носієм	Можливість проведення швидкої регенерації носія, високий рівень чистоти одержаних препаратів	[40]
Адсорбція на активованому вугіллі	Здатність ПАР адсорбуватись на активованому вугіллі та десорбуватись органічними розчинниками	Колонки, заповнені сорбційним матеріалом, або безпосереднє внесення вугілля в культуральну рідину	Можливість одержання високоочищених препаратів, швидка регенерація сорбенту, низька вартість	[41]
Іонообмінна хроматографія	Полярність молекули ПАР, що зумовлює здатність до обміну зарядженої його частини на рухомі іони катіонів та аніонів	Колонки, заповнені іонообмінною смолою	Можливість одержання високоочищених препаратів, багаторазове використання носія, швидкий процес регенерації	[40]

Так, наприклад, сконцентрована культуральна рідина або неочищені препарати ПАР, одержані на перших стадіях технологічного процесу, мають низьку вартість і їх можна використовувати у нафтовидобувній, текстильній галузях та для очищення екосистем від нафтових забруднень. Натомість високоочищені препарати ПАР, що застосовуються виключно у фармацевтичній, харчовій, косметичній промисловості, можуть бути одержані в результаті додаткових етапів очищення вихідних напівпродуктів. Така багатоступенева технологія має впроваджуватись на підприємствах, що виробляють продукцію для широкого спектра галузей промисловості.

Мутантні і рекомбінантні штами — надсинтетики поверхнево-активних речовин

Окрім оптимізації складу живильного середовища та умов культивування, вибору ефективного методу виділення цільового метаболіту, комерційна складова будь-якого біотехнологічного процесу залежить від потенційних можливостей штаму-продуцента. У сучасних умовах промислові масштаби виробництва потребують використання нових високоактивних мутантних і рекомбінантних штамів, здатних до максимально повної трансформації субстратів у поверхнево-активні речовини. Використання таких модифікованих продуцентів дасть змогу підвищити ефективність технологічного процесу та одержувати ПАР із заданими властивостями. Для одержання надпродуцентів ПАР використовують транспозони [50], іонізуюче випромінювання [51], хімічні мутагени типу N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин [52] або процеси селекції на основі резистентності до іонних детергентів [47] тощо (табл. 3.)

За останні роки було одержано низку високоефективних рекомбінантних штамів-надсинтетиків ПАР. Так, із використанням як вектора плазмиди pC112 сконструйовано штам *Bacillus subtilis* MI 113 уведенням гена *lpa-14*, відповідального за синтез сурфактину [53]. На середовищах із соєвим борошном рекомбінантний штам синтезував у 8 разів більше сурфактину, ніж вихідний. Створено ряд рекомбінантних штамів *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* — надсинтетиків рамноліпідів [54].

Застосування генно-інженерних методів дає змогу не лише підвищити продуктивність штамів, а й змінювати хімічний склад синтезованих ними поверхнево-активних речовин. Так, зміна нуклеотидної послідовності гена, що кодує синтез сурфактину, супроводжувалась зміною складу ферментного комплексу і, як наслідок, синтезом нового ПАР (ліхенізин) штамом *Bacillus subtilis* [55].

Відомо, що *Pseudomonas aeruginosa* (продуцент рамноліпідів) не здатен використовувати для росту й біосинтезу ПАР лактозу. Введення у клітини бактерій гена *lacZY* з *Escherichia coli* дало змогу створити штами, що синтезували рамноліпіди на середовищі з молочною сироваткою [56].

Нещодавно було створено новий рекомбінантний штам *Gordonia amarae* введенням стійкого гена гемоглобіну (*vgb*), що дало змогу в чотири рази підвищити синтез трегалозоліпідів [57].

Фізіологічні основи регуляції синтезу поверхнево-активних речовин

Ще одним підходом до підвищення ефективності технологій одержання продуктів мікробного синтезу є внесення екзогенних попередників у середовище культивування продуцента. Так, раніше нами було показано

Таблиця 3. Ефективність використання для синтезу поверхнево-активних речовин мутантних штамів

Мутантний штам	Спосіб одержання	Підвищення синтезу ПАР, %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 59C7	Уведення транспозона Tn5-GM у <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PG201	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PTCC 1637	Оброблення N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідином	900
<i>Bacillus licheniformis</i> KGL11	Оброблення N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідином	1100
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 55033	Оброблення N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідином	300–500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> EBN-8	Дія γ -випромінювання на <i>Pseudomonas aeruginosa</i> S8	100–200
<i>Bacillus subtilis</i> Suf-1	Дія ультрафіолету на <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332	200–300
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1	Селекція на основі резистентності до катіонних детергентів	100–200

можливість інтенсифікації синтезу мікробного полісахариду етаполану додаванням у середовище C₄-дикарбонових кислот — інтермедіатів метаболізму етанолу, які є попередниками глюконеогенезу [58]. З літератури відомо, що за присутності попередників підвищується синтез макролідних антибіотиків [59, 60]. У 80–90-х роках ХХ ст. дослідниками було встановлено стимулюючий вплив цитрату натрію на утворення ПАР мікроорганізмами [61–63]. Такий ефект пояснюють активуючим впливом цитрату на фермент ацетил-КоА-карбоксилазу, який каталізує перетворення ацетил-КоА на малоніл-КоА, що, у свою чергу, супроводжується підвищенням синтезу жирних кислот, а отже, і ПАР ліпідної природи [64].

Наші дослідження довели можливість інтенсифікації синтезу поверхнево-активних речовин штамом *R. erythropolis* ЕК-1 за наявності у середовищі з етанолом цитрату (регулятора синтезу ліпідів) і фумарату (попередника глюконеогенезу).

Встановлено, що збільшення на 40–100% показників синтезу ПАР за умови внесення цитрату (0,1%) і фумарату (0,2%) на початку стаціонарної фази росту продуцента зумовлено активацією глюконеогенетичної гілки обміну і посиленням синтезу ліпідів, про що свідчило підвищення в 1,4–1,5 і 3,4–3,6 раза активності ізоцитратліази і фосфоенолпіруватсинтетази, відповідно, а також зниження в 1,5–1,6 раза активності ізоцитратдегідрогенази.

Слід зазначити, що відомі на цей час літературні дані свідчать про можливість інтенсифікації синтезу ПАР за присутності цитрату [61–65], проте встановлені нами закономірності відрізняються від описаних у літературі. Так, згідно з літературними даними, цитрат у концентрації 0,5–1,0% вносили на початку процесу культивування продуцентів ПАР. За такої концентрації цитрат можна розглядати як додатковий ростовий субстрат, а не регулятор синтезу ліпідів. На сьогодні у літературі практично відсутні відомості про вплив C₄-дикарбонових кислот — попередників глюконеогенезу на синтез ПАР. Відомо, що внесення солей органічних кислот циклу Кребса (сукцинату і фумарату в концентрації 0,5%) у середовище культивування *Bacillus subtilis* С-14 на початку процесу культивування супроводжувалось підвищенням кількості синтезованих ПАР у 1,5–2 рази [66]. При цьому спостерігали також збільшення рівня біомаси, індексу емульгування і показника умовної концентрації ПАР.

Варто зауважити, що нам не вдалося віднайти літературні дані щодо підвищення синтезу ПАР за одночасної присутності у середовищі культивування як цитрату (регулятора синтезу ліпідів), так і C₄-дикарбонових кислот (попередників глюконеогенезу). Окрім того, дотепер практично не досліджено механізми, що забезпечують інтенсифікацію утворення ПАР у відповідь на присутність у середовищі попередників їх синтезу. Так, у [62] встановлено, що за присутності цитрату спостерігається зниження активності ізоцитратдегідрогенази у клітинах *Bacillus subtilis*, тобто збільшення синтезу сурфактину автори пояснюють переважними витратами субстрату вуглецю на процеси біосинтезу ПАР. Водночас для дріжджів *Torulopsis apicola* — продуцента поверхнево-активних гліколіпідів — встановлено, що механізм дії цитрату натрію полягає у підтриманні рН на оптимальному для синтезу ПАР рівні за рахунок підлучення культуральної рідини в результаті транспортування цитрату шляхом симпорту з протоном, що й забезпечує збільшення синтезу ПАР [61]. Аналогічний вплив на синтез ПАР *Torulopsis apicola* справляли солі й інших органічних кислот (сукцинату, тартрату і малонату).

Отже, з аналізу літературних і власних експериментальних даних авторів випливає, що організація промислового виробництва ПАР потребує попереднього ґрунтовного вивчення економічної ефективності цього процесу. На сьогодні собівартість мікробних ПАР є вищою порівняно з хімічними аналогами через низький вихід цільового продукту та високі витрати на його виділення й очищення. Використання дешевих субстратів, оптимізація складу живильного середовища та умов культивування, впровадження на виробництві ступінчастої схеми виділення ПАР можуть суттєво змінити ситуацію. Зниження собівартості цільового продукту може бути досягнуто також за умов використання нових штамів-надсинтетиків ПАР.

ЖИТЕПАТУПА

1. *Cameotra S. S., Makkar R. S.* Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules // *Curr. Opin. Microbiol.* — 2004. — V. 7, N3. — P. 262–266.
2. *Singh P., Cameotra S. S.* Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences // *Trends Biotechnol.* — 2004. — V. 22, N3. — P. 142–146.
3. *Rodrigues L., Banat I. M., Teixeira J., Oliveira R.* Biosurfactants: potential applications in medicine // *J. Antimicrob. Chemother.* — 2006. — V. 57, N4. — P. 609–618.
4. *Ron E. Z., Rosenberg E.* Natural roles of biosurfactants // *Environ. Microbiol.* — 2001. — V. 3, N 4. — P. 229–236.
5. *Desai J. D., Banat I. M.* Microbial production of surfactants and their commercial potential // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* — 1997. — V. 61, N1. — P. 47–64.
6. *Banat I. M., Makkar R. S., Cameotra S. S.* Potential commercial applications of microbial surfactants // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2000. — V. 53, N5. — P. 495–508.
7. *Makkar R. S., Cameotra S. S.* An update on use of unconventional substrates for biosurfactants production and their new applications // *Ibid.* — 2002. — V. 58, N4. — P. 428–434.
8. *Raza Z. A., Rehman A., Khan M. S., Khalid Z. M.* Improved production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* mutant using vegetable oil refinery wastes // *Biodegradation.* — 2007. — V. 18, N1. — P. 115–121.
9. *Shah V., Jurjevic M., Badia D.* Utilization of restaurant waste oil as a precursor for sophorolipid production // *Biotechnol. Prog.* — 2007. — V. 23, N2. — P. 512–515.
10. *Trummler K., Effenberger F., Syldatk C.* An integrated microbial/enzymatic process for production of rhamnolipids and l-(+)-rhamnose from rapeseed oil with *Pseudomonas* sp. DSM 2874 // *Eur. J. Lipid. Sci. Tech.* — 2003. — V. 105. — P. 563–571.
11. *Vance-Harrop M. H., de Gusmao N. B., de Campos-Takaki G. M.* New bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* using D-glucose and babassu oil as carbon sources // *Braz. J. Microbiol.* — 2003. — V. 34. — P. 120–123.
12. *Pekin G., Vardar-Sukan F., Kosaric N.* Production of sophorolipids from *Candida bombicola* ATCC 22214 using Turkish corn oil and honey // *Eng. Life Sci.* — 2005. — V. 5, N4. — P. 357–362.
13. *Rahman K. S., Rahman T. J., McClean S. et al.* Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials // *Biotechnol. Prog.* — 2002. — V. 18, N 6. — P. 1277–1281.
14. *Ferraz C., de Araujo A. A., Pastore G. M.* The influence of vegetable oils on biosurfactant production by *Serratia marcescens* // *Appl. Biochem. Biotechnol.* — 2002. — V. 98–100. — P. 841–847.
15. *Kim H. S., Jeon J. W., Kim B. H. et al.* Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, by *Candida* sp. SY16 using fed batch fermentation // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2006. — V. 70, N4. — P. 391–396.
16. *Nitschke M., Costa S. G., Haddad R. et al.* Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LB1 // *Biotechnol. Prog.* — 2005. — V. 21, N5. — P. 1562–1566.
17. *Benincasa M., Contiero J., Mansera M. A., Moraes I. O.* Rhamnolipid production by *P. aeruginosa* LB1 growing on soapstock as the sole carbon source // *J. Food Eng.* — 2002. — V. 54. — P. 283–288.
18. *Benincasa M., Abalos A., Oliveira I., Mansera A.* Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock // *Anton. Leeuw. Int. J. G.* — 2004. — V. 85, N1. — P. 1–8.
19. *Abalos A., Pinazo A., Infante M. R. et al.* Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes // *Langmuir.* — 2001. — V. 17, N5. — P. 1367–1371.
20. *Bednarski W., Adamczak M., Tomasik J., Plaszczyk M.* Application of oil refinery waste in biosynthesis of glycolipids by yeast // *Bioresour. Technol.* — 2004. — V. 95, N1. — P. 15–18.
21. *Dubey K., Juwarkar A.* Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production // *World J. Microbiol. Biotechnol.* — 2001. — V. 17, N1. — P. 61–69.
22. *Dubey K., Juwarkar A.* Determination of genetic basis for biosurfactant production in distillery and curd whey wastes utilizing *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2 // *Indian J. Biotechnol.* — 2004. — V. 3, N1. — P. 74–81.
23. *Thompson D. N., Fox S. L., Bala G. A.* Biosurfactants from potato process effluents // *Appl. Biochem. Biotechnol.* — 2000. — V. 84–86. — P. 917–930.
24. *Thompson D. N., Fox S. L., Bala G. A.* The effects of pretreatments on surfactin production from potato process effluent by *Bacillus subtilis* // *Ibid.* — 2001. — V. 91–93. — P. 487–502.
25. *Noah K. S., Bruhn D. F., Bala G. A.* Surfactin production from potato process effluent by *Bacillus subtilis* in a chemostat // *Ibid.* — 2005. — V. 121–124. — P. 465–473.

26. Noah K. S., Fox S. L., Bruhn D. F. et al. Development of continuous surfactin production from potato process effluent by *Bacillus subtilis* in an airlift reactor // *Ibid.* — 2002. — V. 98–100. — P. 803–813.
27. Nitschke M., Pastore G. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater // *Bioresour. Technol.* — 2006. — V. 97, N2. — P. 336–341.
28. Nitschke M., Pastore G. M. Cassava flour wastewater as a substrate for biosurfactant production // *Appl. Biochem. Biotechnol.* — 2003. — V. 105–108, N3. — P. 295–301.
29. Nitschke M., Pastore G.M. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using cassava-processing effluent // *Ibid.* — 2004. — V. 112, N3. — P. 163–172.
30. Пирог Т. П., Шевчук Т. А., Волошина И. Н., Гречирчак Н. Н. Использование иммобилизованных на керамзите клеток нефтеокисляющих микроорганизмов для очистки воды от нефти // *Прикл. биохим. микробиол.* — 2005. — Т. 41, №1. — С. 58–63.
31. Пирог Т. П., Шевчук Т. А., Волошина И. Н., Карпенко Е. И. Образование поверхностно-активных веществ при росте штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭЖ-1 на гидрофильных и гидрофобных субстратах // *Там же.* — 2004. — Т. 40, №5. — С. 544–550.
32. Пирог Т. П., Антонюк С. І. Особливості синтезу поверхнево-активних речовин штамом *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 // *Наук. праці Нац. ун-ту харчових технологій.* — 2007. — №22. — С. 50–53.
33. Carvalho C. de, Parreno-Marchante B., Neumann G. et al. Adaptation of *Rhodococcus erythropolis* DCL14 to growth on *n*-alkanes, alcohols and terpenes // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2005. — V. 67. — P. 383–388.
34. Carvalho C. de, Fonseca M. da. Degradation of hydrocarbons and alcohols at different temperatures and salinities by *Rhodococcus erythropolis* DCL14 // *FEMS Microbiol. Ecol.* — 2005. — V. 51. — P. 388–399.
35. Rosenberg E., Ron E.Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 1999. — V. 52. — P. 154–162.
36. Macdonald C. R., Cooper D. G., Zajic J. E. Surface-active lipids from *Nocardia erythropolis* grown on hydrocarbons // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1981. — V. 41, N1. — P. 117–123.
37. Kim S. H., Lim E. J., Lee S. O. et al. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417 // *Biotechnol. Appl. Biochem.* — 2000. — V. 31. — P. 249–253.
38. Yazdani S. S., Gonzales R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 2007. — V. 18. — P. 213–219.
39. Sen R., Swaminathan T. Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin. // *Process Biochem.* — 2005. — V. 40, N9. — P. 2953–2958.
40. Reiling, H. E., Thanei-Wyss U., Guerra-Santos L. H. et al. Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1986. — V. 51, N5. — P. 985–989.
41. Dubey K. V., Juwarkar A. A., Singh S. K. Adsorption-desorption process using wood-based activated carbon for recovery of biosurfactant from fermented distillery wastewater // *Biotechnol. Prog.* — 2005. — V. 21, N3. — P. 860–867.
42. Kuyukina M. S., Ivshina I. B., Philp J. C. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction // *J. Microbiol. Meth.* — 2001. — V. 46, N2. — P. 149–156.
43. Philp J. C., Kuyukina M. S., Ivshina I. B. et al. Alkanotropic *Rhodococcus ruber* as a biosurfactant producer // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2002. — V. 59, N2–3. — P. 318–324.
44. Sen R. Response surface optimization of the critical media components for production of surfactin // *J. Chem. Tech. Biotechnol.* — 1997. — V. 68, N3. — P. 263–270.
45. Sen R., Swaminathan T. Application of response-surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 1997. — V. 47. — P. 358–363.
46. Sen R., Swaminathan T. Response surface modeling and optimization to elucidate the effects of inoculum age & size on surfactin production // *Biochem. Eng. J.* — 2004. — V. 21. — P. 141–148.
47. Shabtai Y., Gutnick D. L. Enhanced emulsan production in mutants of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 selected for resistance to cetyltrimethylammonium bromide // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1986. — V. 52. — P. 146–151.
48. Davis D. A., Lynch H. C., Varley J. The application of foaming for recovery of surfactin from *B. subtilis* ATCC 21332 // *Enzyme Microb. Technol.* — 2001. — V. 28, N4–5. — P. 346–354.
49. Ramnani P., Kumar S. S., Gupta R. Concomitant production and downstream processing of alkaline protease and biosurfactant from *Bacillus licheniformis* RG1: bioformulation as detergent additive // *Process Biochem.* — 2005. — V. 40, N10. — P. 3352–3359.

50. Koch A. K., Kappeli O., Fiechter A., Reiser J. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants // J. Bacteriol. — 1991. — V. 173, N13. — P. 4212–4219.
51. Tahzibi A., Kamal F., Assadi M. M. Improved production of rhamnolipids by a *Pseudomonas aeruginosa* mutants // Iran. Biomed. J. — 2004. — V. 8, N1. — P.25– 31.
52. Lin S. C., Lin K. G., Lo C. C., Lin Y. M. Enhanced biosurfactant production by a *Bacillus licheniformis* mutant // Enzyme Microb. Technol. — 1998. — V. 23. — P. 267–273.
53. Ohno A., Ano T., Shoda M. Production of a lipopeptide antibiotic, surfactin, by recombinant *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation // Biotechnol. Bioeng. — 1995. — V. 47. — P. 209– 214.
54. Ochsner U. A., Reiser J., Fiechter A., Wilholt B. Production of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid biosurfactants in heterologous hosts // Appl. Environ. Microbiol. — 1995. — V. 61, N9. — P. 3503– 3506.
55. Yakimov M. M., Giuliano L., Timmis K. N., Golyshin P. N. Recombinant acylheptapeptide lichenysin: high level of production by *Bacillus subtilis* cells // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. — 2000. — V. 2, N2. — P. 217–224.
56. Koch A. K., Reiser J., Kappeli O., Fiechter A. Genetic construction of lactose-utilizing strains of *Pseudomonas aeruginosa* and their application in biosurfactant production // Nat. Biotechnol. — 1988. — V. 6. — P. 1335– 1339.
57. Dogan I., Pagilla K. R., Webster D. A., Stark B. C. Expression of *Vitreoscilla* haemoglobin in *Gordonia amarae* enhances biosurfactant production // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. — 2006. — V. 33, N8. — P. 693–700.
58. Малашенко Ю. Р., Пирог Т. П., Гринберг Т. А., Пинчук Г. Э. Регуляция синтеза экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. на среде с этанолом // Микробиол. журн. — 1993. — №2. — С. 35–41.
59. Миронов В. А., Сергеева А. В., Воронкова В. В., Даниленко В. Н. Биосинтез авермектинов: физиологические и технологические аспекты // Антибиот. химиотер. — 1997. — Т. 42, № 3. — С. 31–36.
60. Навашин М. С., Федоренко В. А., Настасьян И. Н. и др. Генетический и биохимический контроль биосинтеза макролидных антибиотиков // Там же. — 1990. — Т. 35, № 12. — С. 34–38.
61. Stuver O., Hommel R., Haferburg D., Kleber H.P. Production of crystalline surface-active glycolipids by a strain *Torulopsis apicola* // J. Biotechnol. — 1987. — V. 6. — P. 259–269.
62. De Roubin M. R., Mulligan C. N., Gibbs B. F. Correlation of enhanced surfactin production with decreased isocitrate dehydrogenase activity // Can. J. Microbiol. — 1989. — V. 35, N9. — P. 854–859.
63. Лесык О. Ю., Елисейев С. А., Полулях О. В., Карпенко Ю. В. Образование поверхностно-активного комплекса культурой каротинообразующих дрожжей *Phaffia rhodozyma* и его эмульгирующие свойства // Микробиол. журн. — 1991. — Т. 53, №2. — С. 36–40.
64. Kosaric N., Cairns W. L., Cray N. C. C. The role of nitrogen in microorganism strategies for biosurfactant production // JACS. — 1984. — V.16, N11. — P.1735–1743.
65. Вильданова-Марцишин Р. И. Биосинтез поверхностно-активных веществ штаммами *Rhodococcus fascians* ВКМ АС-1169, *Rhodococcus fascians* ВКМ АС-1163 и *Pseudomonas* sp. PS-17: Дис....канд. биол. наук. — К.: Ин-т микробиологии и вирусологии НАН Украины, 2004. — 155с.
66. Шульга А. Н. Поверхностно-активные соединения, образуемые культурой бактерий *Bacillus subtilis* С-14: Дис....канд. биол. наук. — К.: Ин-т микробиологии и вирусологии НАН Украины, 1993. — 163 с.

**МИКРОБНЫЕ ПОВЕРХНОСТНО-
АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА:
ПРОБЛЕМЫ ПРОМЫШЛЕННОГО
ПРОИЗВОДСТВА**

Т. П. Пирог, С. В. Игнатенко

Национальный университет
пищевых технологий, Киев

E-mail: tapirog@usuft.kiev.ua

Представлены литературные и собственные экспериментальные данные авторов, касающиеся состояния и перспектив развития промышленного производства микробных поверхностно-активных веществ (ПАВ). Отмечается, что высокая на сегодняшний день себестоимость микробных ПАВ обусловлена большими затратами на биосинтез и выделение целевого продукта, а также невысокой продуктивностью штаммов-продуцентов. Исследования, направленные на решение этих проблем, являются ключевыми и приоритетными в биотехнологии микробных ПАВ. Эффективность технологий микробных ПАВ может быть повышена за счет использования в качестве ростовых субстратов промышленных отходов, оптимизации условий культивирования продуцентов, внесения в среду предшественников биосинтеза, разработки рентабельных методов выделения ПАВ и получения штаммов-сверхсинтетиков, в том числе и рекомбинантных.

Ключевые слова: поверхностно-активные вещества, технология биосинтеза, эффективность производства, промышленные отходы, условия культивирования, микроорганизмы-продуценты, выделение целевого продукта.

**MICROBIAL
SURFACE-ACTIVE SUBSTANCES:
PROBLEMS OF COMMERCIAL
PRODUCTION**

T. P. Pirog, S. V. Ignatenko

National University of Food Technology, Kyiv

E-mail: tapirog@usuft.kiev.ua

The review represents the data concerning state and perspective of development of surface-active substances (SAS) commercial production. Now the high prime cost of microbial SAS is conditioned by large costs on their biosynthesis, recovery and purification of base product and also low yields in production processes. The investigations directed on decision of these problems are key and priority in biotechnology of microbial SAS. The efficiency of microbial SAS technologies can be higher due to using of cheaper raw materials as growth substrates, optimization of cultivation conditions, addition into medium of biosynthesis of precursors and development of economically rational methods of SAS recovery and obtain hyper-producing strains including recombinant microorganisms.

Key words: surfactant species, biosynthesis technology, productive efficiency, factory waste, cultivation conditions, microorganisms-producers, isolation of desired product.

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ

А. Ю. ПЕТРЕНКО, Э. Н. ИВАНОВ, Ю. А. ПЕТРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

E-mail: alexander_petrenko@cryo.org.ua

Благодаря ряду уникальных свойств и, в частности, способности дифференцироваться в различные типы клеток соединительной ткани, мезенхимальные стволовые клетки (МСК) привлекают пристальное внимание исследователей. Эти свойства определяют перспективность применения МСК в биотехнологии и регенеративной медицине. В настоящее время большинство работ посвящено изучению свойств МСК, выделенных из костного мозга взрослого человека. В строме жировой ткани также обнаружены популяции стромальных стволовых/прогениторных клеток с мультилинейным потенциалом дифференцировки. В обзоре обобщен опыт экспериментальных работ, посвященных выделению стромальных клеток из жировой ткани и выяснению их биологических свойств. Стромальные клетки жировой ткани обладают схожим с МСК костного мозга иммунофенотипом и способностью к мультилинейной дифференцировке. Вместе с тем описаны некоторые отличия МСК, изолированных из этих источников.

Ключевые слова: стволовые клетки, жировая ткань, иммунофенотип, дифференцировочный потенциал, костный мозг.

Жировая ткань происходит из эмбриональной мезенхимы. У взрослого человека в состав жировой ткани входят жировые клетки — адипоциты, а также клетки, составляющие стромально-васкулярную фракцию (СВФ) жировой ткани: преадипоциты, эндотелиальные и гладкомышечные клетки кровеносных сосудов, периваскулярные фибробласты и поддерживающая волокнистая коллагеновая строма (рис. 1). В строме была обнаружена популяция стволовых/прогениторных клеток с мультилинейным потенциалом дифференцировки, во многом сходных с мезенхимальными стволовыми клетками (МСК), происходящими из костного мозга (КМ). Учитывая, что жировая ткань в значительных количествах (до 300 мл и более) может быть получена под местной анестезией при сравнительно малоболезненной косметической липосакции, липоаспирации подкожного жира или путем эксцизии жировых отложений, эта ткань может явиться альтернативным костному мозгу источником МСК для трансплантации и тканевой инженерии.

Выделение стромальных клеток из жировой ткани

Zuk et al. [1, 2] впервые установили, что жировая ткань человека является источником мультипотентных стволовых клеток

(СК), причем источником достаточно богатым — из 300 мл жира авторы получали от 10 до $20 \cdot 10^6$ клеток, названных ими «СК обработанного липоаспирата» (processed lipospirite, PLA). Метод этих авторов, схематически приведенный на рис. 1, заключался в обработке липоаспирата коллагеназой (фрагменты жировой ткани инкубировали при 37°C в 0,075% -м растворе коллагеназы типа I в течение 30 мин). Центрифугирование первичной суспензии приводило к ее разделению на две фракции. В верхнем светлом слое располагались адипоциты, а в осадке — клетки СВФ с примесью гемопоэтических клеток. Эритроциты удаляли с помощью инкубации в лизирующем растворе хлорида аммония, а другие гемопоэтические клетки, обладающие слабой адгезивной способностью, элиминировались при пассировании.



Рис. 1. Схема выделения стромальных клеток из жировой ткани

Результаты наших исследований [3] показали, что первичная культура адгезивных клеток жировой ткани состоит из морфологически различающихся клеток, что связано с разнообразием исходного спектра клеток в составе СВФ. В ходе монослойного культивирования происходит постепенная очистка культур от слабоадгезивных клеток, и на 5-е сутки культивирования наблюдается равномерный рост клеток по всей поверхности культурального пластика. К 10–12-м суткам культивирования адгезивные клетки СВФ жировой ткани формируют 70–80% конфлюэнтного монослоя. В ходе субкультивирования время достижения указанного состояния монослоя составляет в среднем 3 суток на протяжении 5 пассажей. В процессе субкультивирования гетерогенность исходной суспензии постепенно снижается, и уже после 3–4 пассажей культура СКЖТ представлена популяцией преимущественно фибробластоподобных клеток. В ходе каждого пассажа количество клеток увеличивается в среднем в 2 раза, что согласуется с данными работы [1].

Описанный метод выделения применялся в том же или несколько измененном виде во всех последующих исследованиях СК жировой ткани, но при этом часто изолированные клетки получали новое название: адгезивные клетки стромы из жира человека (human adipose-derived adherent stromal, hADAS) [4]; стромальные клетки, происходящие из жира (adipose-derived stromal cells, ASCs) [5]; происходящие из жировой ткани СК взрослых (adipose derived adult stem cells, ADAS); мезенхимальные стволовые клетки, происходящие из жира (adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, ATD-MSC) [6, 7], и др. Нам представляется, что термин «стромальные клетки жировой ткани» (СКЖТ), широко используемый как в иностранной, так и русскоязычной литературе [5, 8], вполне точно обозначит объект нашего внимания.

Иммунофенотип стромальных клеток жировой ткани

Иммунофенотипическая характеристика СКЖТ взрослого человека, полученная различными авторами, приведена в табл. В целом, при анализе экспрессии поверхностных белков было установлено, что СКЖТ, исследованные после субкультивирования клеток СВФ, подобно МСК костного мозга, экспрессируют CD29, CD44, CD71, CD90, CD105/SH2 и SH3 и не экспрессируют CD31,

CD34 и CD45. Однако при сравнении с МСК КМ, проведенном в работе [1], были выявлены отличия в двух маркерах: СКЖТ экспрессировали CD49d и не содержали CD106, в то время как МСК КМ, наоборот, экспрессировали CD106, но не CD49d. Поскольку CD106 являются лигандами рецепторов, участвующих в хоминге ГСК и их мобилизации из костного мозга [9], отсутствие их опровергает принадлежность СКЖТ к клеткам гемопоэтической линии.

У СКЖТ, полученных от 7 различных доноров, наиболее постоянными поверхностными белками, выявляемыми у 97% клеток, были HLA-ABC, CD29 (интегрин β 1), CD49e (интегрин α 5/VLA5), CD51 (интегрин α V) и CD90 (Thy-1). Более вариabильными были белки CD49b (интегрин α 2/VLA-2), CD49d (интегрин α 4/VLA-4), CD61 (интегрин β 3), CD138 и CD140a. Остальные из 24 изученных маркеров отсутствовали или выявлялись только у небольшого числа клеток [4].

Относительно экспрессии на СКЖТ общепризнанного маркера ГСК и их ранних потомков CD34 существуют некоторые противоречия. Авторы работ [10, 11] выявили популяцию CD34 в суспензии жировых клеток. Эти данные позволили предположить наличие общего предшественника у клеток с эндотелиальным и адипоцитарным фенотипом [11]. Гистологический анализ жировой ткани, проведенный Трактуевым и др. [8], показал, что CD34-позитивные клетки равномерно распределены в ткани и располагаются между адипоцитами. Однако в исследованиях других лабораторий [12, 13] его экспрессия проявлялась очень слабо или вообще не обнаруживалась. Это может быть обусловлено несколькими причинами: модификациями метода выделения, видом использованных антител, условиями и временем культивирования.

Исследования Cao et al. [12], в которых изучали эндотелиальную дифференцировку СКЖТ *in vitro* и *in vivo*, подтвердили наличие в этих клетках CD29, CD44, CD105, CD166 и Flk1 (один из рецепторов VEGF, являющийся самым ранним дифференцировочным маркером эндотелия и клеток крови), но не кроветворных или эндотелиальных маркеров (CD31, CD34, CD45, CD106 и CD184). При культивировании в среде, содержащей VEGF и bFGF, СКЖТ приобретали морфологию эндотелиальных клеток, экспрессировали CD34, PECAM, VE-кадгерин, eNOS и способствовали неоваскуляризации иммунодефицитных мышей при трансплантации, сохраняя при этом экспрессию CD34

Характеристика субкультивированных СКЖТ человека

Автор	Фенотип	Дифференцировка	Факторы, индуцирующие дифференцировку
Gronthos et al. [10]	<p><u>Позитивны по:</u> HLA-ABC, CD9, CD10, CD13, CD29, CD34, CD44, CD59, CD105, CD49e, CD54, CD55, CD166</p> <p><u>Негативны по:</u> HLA-DR, CD11a, CD11b, CD11c, CD14, CD18, CD31, CD45, CD50, CD56</p>	<i>In vitro:</i> остеогенная, адипогенная	<p><u>Остеогенные:</u> витамин D₃, дексаметазон</p> <p><u>Адипогенные:</u> инсулин, дексаметазон, 1-метил-3-изобутилксантин, BRL49653</p>
Zuk et al. [1, 2]	<p><u>Позитивны по:</u> CD13, CD29, CD44, CD49d, CD71, CD90, CD105, SH3, STRO-1</p> <p><u>Негативны по:</u> CD31, CD34, CD45, CD14, CD16, CD56, CD61, CD62E, CD104, CD106</p>	<i>In vitro:</i> остеогенная, адипогенная, хондрогенная, миогенная, нейрогенная	<p><u>Остеогенные:</u> витамин D₃, аскорбат, β-глицерофосфат</p> <p><u>Хондрогенные:</u> инсулин, TGF-β1, аскорбат</p> <p><u>Миогенные:</u> сыворотка КРС и человека, гидрокортизон</p> <p><u>Нейрогенные:</u> β-меркаптоэтанол</p>
Planat-Benard et al. [11]	<p><u>Позитивны по:</u> CD34, CD13</p> <p><u>Негативны по:</u> CD31, CD14, CD144, CD45</p>	<i>In vitro</i> и <i>in vivo:</i> эндотелиальная	Спонтанно в метилцеллюлозной среде (Methocult MG3534)
Brzoska et al. [14]	<p><u>Позитивны по:</u> CD10, CD13, CD44, CD90 виментин</p> <p><u>Негативны по:</u> CD31, CD34, CD45, vWF</p>	<i>In vitro:</i> эпителиальная	Ретиноевая кислота
Петренко и др. [3]	<p><u>Позитивны по:</u> CD29, CD44, CD73, CD105</p> <p><u>Негативны по:</u> CD34, CD38, CD45</p>	<i>In vitro:</i> остеогенная, адипогенная	<p><u>Остеогенные:</u> аскорбат, β-глицерофосфат, дексаметазон, сыворотка</p> <p><u>Адипогенные:</u> гидрокортизон, 1-метил-3-изобутилксантин, индометацин</p>
Cao et al. [12]	<p><u>Позитивны по:</u> CD29, CD44, CD105, CD166, Flk1, HLA-ABC</p> <p><u>Негативны по:</u> CD31, CD34, CD45, CD106, CD184</p>	<i>In vitro:</i> остеогенная, адипогенная, <i>in vitro</i> и <i>in vivo:</i> эндотелиальная	<p><u>Остеогенные:</u> аскорбат, β-глицерофосфат, дексаметазон, сыворотка</p> <p><u>Адипогенные:</u> гидрокортизон, 1-метил-3-изобутилксантин, индометацин</p> <p><u>Эндотелиальные:</u> VEGF, b-FGF, ЭСТ</p>
Astori et al. [7]	<p><u>Позитивны по:</u> CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166</p> <p><u>Негативны по:</u> CD34, CD38, CD45, CD133, CD31, CD271</p>	<i>In vitro:</i> остеогенная, адипогенная, хондрогенная	<p><u>Остеогенные:</u> аскорбат, β-глицерофосфат, дексаметазон</p> <p><u>Адипогенные:</u> инсулин, дексаметазон, 1-метил-3-изобутилксантин, индометацин</p> <p><u>Хондрогенные:</u> TGF-β3, аскорбат, дексаметазон, пируват</p>

человека. Эти результаты позволили авторам прийти к заключению, что полученные *in vitro* эндотелиальные клетки с описанными свойствами, которым присуща экспрессия CD34, происходят из СКЖТ, а не из эндотелиальных клеток, содержащихся в исходном клеточном препарате.

Однако проведенный недавно анализ иммунофенотипа клеток СВФ и его изменение в ходе субкультивирования [7,15] позволяют усомниться в правильности выводов Cao et al. [12]. Эти исследования показали, что в первичной суспензии присутствуют клетки, экспрессирующие, главным образом, маркеры эндотелиальных (CD31, CD144, VEGFFr-2, фактор Виллебранта), стромальных (CD13, CD29, CD44, CD63, CD73, CD90, CD166) и кровяных (CD34, CD45, CD11, CD13, CD14) клеток. При культивировании в «стромальной» среде в течение по крайней мере четырех пассажей экспрессия эндотелиальных маркеров сохраняется на уровне первичной суспензии. Следовательно, последующее культивирование в среде с VEGF [12] может способствовать селективному размножению клеток эндотелиального фенотипа.

Определенные успехи были достигнуты и в выяснении природы клеток, экспрессирующих CD34-антиген. В первичной суспензии клеток СВФ были выявлены две популяции CD34-позитивных клеток, причем претенденты на гемопоэтические стволовые клетки и клетки-предшественники (CD34⁺, CD45⁺) составляли лишь около 2% клеток [7]. Для более полного понимания источника гемопоэтических клеток в жировой ткани авторы исследовали колониобразующую активность CD34⁺-клеток, изолированных с помощью магнитной сепарации. Было установлено, что содержание кровяных колониобразующих единиц (КОЕ) в свежеразделенных клетках СВФ сравнимо с периферической кровью. Эти результаты позволяют предполагать, что гемопоэтические CD34⁺-клетки попадают в жировую ткань из циркулирующей крови. При субкультивировании в «стромальной» среде количество клеток, экспрессирующих CD34-антиген, снижается до порога чувствительности метода или вообще исчезает.

Маркеры, ассоциированные со стромальными клетками (CD13, CD29, CD44, CD63, CD73, CD90, CD105), были слабо экспрессированы на свежеразделенных клетках СВФ жира и увеличивались от пассажа к пассажу, превышая 90% на пассаже 4 (P4) (рис. 2). При изучении представленности свыше 170

генов в СКЖТ, полученных от трех доноров, установили, что 66% этих генов были транскрибированы во всех клетках, а 83% — обнаруживались по крайней мере в двух из трех популяций. Наиболее часто транскрибированные гены: эндоглин, FGF 2, 6 и 7, FGF R3, нейропиплин-1, остеоонектин, фибронектин, VEGF-D, TNF-а и MMP2 (желатиназа А) были связаны с адгезией клеток, белками матрикса, ростовыми факторами и рецепторами протеаз. Эти данные указывают на сходство генного профиля СКЖТ и МСК из стромы КМ. В то же время СКЖТ не экспрессировали ряд белков, которые считаются молекулярными маркерами ранних СК, такие как CD133, мембранный транспортер ABCG2 и теломераза [4].

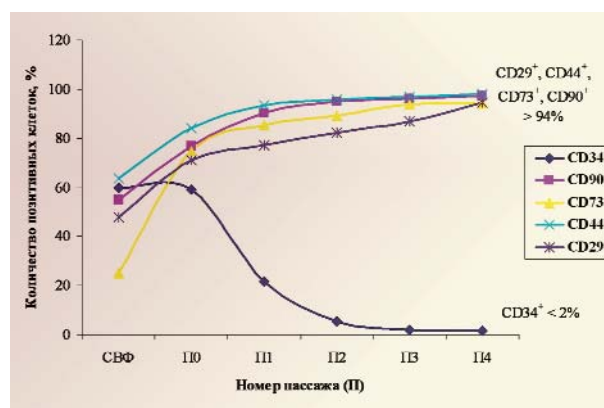


Рис. 2. Изменение иммунофенотипа СКЖТ в ходе субкультивирования (по данным Mitchel et al. [15])

Дифференцировочный потенциал стромальных клеток жировой ткани

Дифференцировка СКЖТ в мезодермальные линии

СКЖТ способны к индуцированной дифференцировке *in vitro* в адипогенном, остеогенном, хондрогенном, эндотелиальном, миогенном, гепатическом, эпителиальном и нейрогенном направлениях. Поскольку до настоящего времени не существует надежных методов определения *in vitro* функциональных свойств хондроцитов, остеоцитов и миоцитов, дифференцировка СКЖТ в адипогенном направлении имеет явное преимущество для изучения биологии развития соединительной ткани, так как адипоциты обладают двумя уникальными свойствами:

1) запасают энергию в форме триглицеридов, которые освобождаются при липолизе в виде глицерола и свободных жирных кислот;

2) секретируют в кровь специфические для жира белки, в частности лептин и адипонектин.

Адипогенная дифференцировка СКЖТ обычно индуцируется внесением в среду изобутилметилксантина, дексаметазона, инсулина или индометацина. Ее эффективность оценивается в культуре на основании появления клеток округлой формы, содержащих внутриклеточные липидные капли, которые окрашиваются красителем масляным красным О (Oil Red O). Кроме того, адипогенная индукция СКЖТ приводит к значительному увеличению активности глицеролфосфатдегидрогеназы — фермента, участвующего в синтезе триглицеридов, а также в экспрессии ряда генов и/или белков, вовлекаемых в биосинтез и хранение липидов, в частности, PPAR γ 2 (жироспецифический фактор транскрипции, функционирующий в преадипоцитах), липопротеиновая липаза (фермент, высвобождающий жирные кислоты из липопротеидов крови, активизирующийся во время липогенеза), аР2-белок (связан с накоплением липидов внутри зрелых адипоцитов), мРНК лептина и GLUT4 [1].

Dicker et al. [16] изучали функциональные свойства адипоцитов человека, полученных путем дифференцировки СКЖТ и МСК, выделенных из КМ. Оба типа клеток проявляли сходную липолитическую способность при стимуляции катехоламинами, включая выраженный антилиполитический эффект, опосредованный через α 2-адренорецепторы. Оба типа клеток с одинаковой скоростью секретировали специфические факторы жировых клеток — лептин и адипонектин и сохраняли способность к дифференцировке в течение, по крайней мере, 15 пассажей.

Остеогенную дифференцировку индуцируют при помещении СКЖТ в среду, содержащую аскорбат, β -глицерофосфат, дексаметазон или витамин D₃. Через 2–4 недели культивирования дифференцировку оценивают по появлению активности щелочной фосфатазы (ЩФ) и кальцификации матрикса, которую визуализируют окрашиванием ализариновым красным и по Ван Коссу. Индукция клеток СКЖТ в «остеогенной» среде, содержащей витамин D₃, приводит к развитию процессов, свидетельствующих об остеогенезе: раннему повышению активности ЩФ и минерализации матрикса; экспрессии большинства генов, подтверждающих остеогенную дифференцировку, а именно *c-fos* и *msx2* — генов, участвующих в диффе-

ренцировке остеобластов; RXR-ретиноидных рецепторов; VDR — рецепторов витамина D; PTHrP — рецепторов паратгормона; остеопонтина; остеоонектина; CBFA-1 — фактора транскрипции, связывающего с промоторами ряда остеогенных генов, и коллагена типа I [1]. Авторы наблюдали также раннюю экспрессию остеокальцина, подавляемую экспозицией с дексаметазоном. При исследовании СКЖТ была подтверждена чрезвычайно важная роль костного морфогенетического белка 2 (КМБ-2) в качестве остеоиндуктивного фактора. Клетки СКЖТ, инфицированные аденовирусом, несущим сДНК КМБ-2, были способны сами образовывать КМБ-2.

Хондрогенная дифференцировка СКЖТ в средах, содержащих TGF- β 1, инсулин и аскорбат, характеризуется образованием плотных узелков, проявляющих типичные черты клеток, развивающихся в направлении хондрогенеза, а именно: накопление сульфатированных протеогликанов и появление изоформы коллагена типа II и богатых лейцином небольших протеогликанов декорина и бигликана; поздняя экспрессия коллагена типа X — маркера гипертрофических хондроцитов; экспрессия ряда факторов транскрипции, таких как *myf6*, *myf5*, *myod1*, миогенин, и структурных белков десмина и миозина [1]. Erickson et al. [17] продемонстрировали, что СКЖТ человека могут образовывать у иммунодефицитных мышей характерные молекулы хрящевого матрикса. Lin et al. [5], пометив СКЖТ зеленым флуоресцирующим белком (GFP), доказали, что они могут быть индуцированы к хондрогенезу *in vitro*. Методами иммуноцитохимии, PCR-RT и Western blot в меченых дифференцированных клетках были выявлены такие важные компоненты хрящевой ткани, как SOX9, коллаген типа I, коллаген типа II, агрекан и коллаген типа X. При длительном культивировании в монослое хондрогенные линии СКЖТ подвергались, подобно нормальным хондроцитам, фенотипической модуляции, определяемой как дедифференцировка.

Исследования хондрогенной дифференцировки СКЖТ *in vitro* и *in vivo* предполагают перспективность их использования для восстановления дефектов хряща. Вследствие слабой регенеративной способности хондроцитов поражения хрящевой ткани не поддаются спонтанному восстановлению и заживлению. В этих случаях трансплантация аутологичных СК или созданной на их основе биоинженерной конструкции может компенсировать дефект хрящевой ткани.

В настоящее время как исходный материал для биоинженерии хряща используются клеточные популяции надкостницы или КМ, содержащие СК, которые могут быть индуцированы к хондрогенезу. Однако получение СК из этих источников не обеспечивает большого выхода клеток, а методы их выделения трудоемки и болезненны для пациентов. Напротив, хондрогенная индукция СКЖТ в среде, содержащей трансформирующий фактор роста (TGF- β 1), обеспечивает высокий темп пролиферации хондроцитов и синтез внеклеточного матрикса. Короткое время жизни ростовых факторов может быть препятствием для пролиферации хондроцитов *in vivo*. К тому же прямое введение TGF- β 1 в организм пациента небезопасно из-за возможности развития воспаления, образования остеофибов, фиброза и эрозии хряща. Можно предположить, что сохранение необходимой концентрации TGF- β 1 будет обеспечено применением СКЖТ, генетически модифицированных к образованию необходимой концентрации TGF- β 1. С другой стороны, более реальным для практической медицины подходом является направленная индукция хондрогенной дифференцировки СКЖТ в культуре с последующей трансплантацией в зону повреждения. Однако прежде всего необходимо ответить на вопрос: могут ли клетки, полученные из жировой ткани, выполнять функцию хряща *in vivo*.

Nathan et al. [6] на основании биомеханических и морфологических исследований показали, что в регенерации остеохондральных дефектов мышечка бедра кролика СКЖТ проявили себя лучше, чем МСК, выделенные из надкостницы. Сравнительное изучение способности СК, выделенных из КМ, надкостницы и жировой ткани, корректировать частичную задержку роста кости у кроликов было проведено в работе James et al. [18]. Авторы отмечают, что все исследованные клеточные препараты демонстрировали хондрогенный и остеогенный потенциал дифференцировки *in vitro*. Вместе с тем, в системе *in vivo* лучшую коррекцию роста кости обеспечивали препараты из КМ и надкостницы. Исследователи из Кореи, сравнившие потенциал остеогенеза и хондрогенеза у СКЖТ и МСК КМ, также отдали предпочтение последним [19].

Для эндотелиальной дифференцировки *in vitro* СКЖТ вносили в лунки планшета с матриксом в среду, содержащую VEGF, b-FGF и сыворотку [12]. Эндотелиальный фенотип устанавливали по экспрессии эндотелиальных маркеров, включающих CD31

(PECAM), CD34, CD144 (VE-кадгерин) и NO-синтазы эндотелиальных клеток (eNOS). Авторы показали, что при культивировании в этих условиях СКЖТ экспрессировали эндотелиальные маркеры. При этом ингибитор киназы PI3 LY294002 блокировал дифференцировку в эндотелиальном направлении. *In vivo* СКЖТ дифференцировались в эндотелиальные клетки под влиянием местных сигналов и способствовали неангиогенезу у мышей с ишемией задних конечностей. Эти результаты свидетельствуют о том, что СКЖТ могут быть потенциальным источником эндотелиальных клеток для проведения клеточной противостенокардиальной терапии.

Способность СКЖТ дифференцироваться в миогенном направлении была установлена в пионерских работах Zuk et al. [1, 2] по выделению этих клеток. В качестве индукторов миогенной дифференцировки авторы использовали гидрокортизон в сочетании с сывороткой (табл. 1). В работах [20, 21] выявлена спонтанная дифференцировка первичной суспензии клеток СВФ в миогенном направлении. Причем, миогенная дифференцировка увеличивалась при культивировании в присутствии миобластов как в условиях, исключающих контакт клеток, так и при их совместном культивировании [21]. После сокультивирования и трансплантации в ишемически поврежденные мышцы иммунодефицитных мышей клетки СВФ встраивались в мышечные волокна и экспрессировали дистрофин.

После культивирования в течение 6 недель (3 пассажа) в специфичной для гладких мышц среде в присутствии гепарина клетки СВФ экспрессировали миогенные маркеры – α -актин (ASMA), кальпонин, кальдесмон, SM22, тяжелую цепь миозина (myosin heavy chain, MHC) и смустелин [22]. Следует подчеркнуть, что наличие вышеперечисленных маркеров было подтверждено параллельно генетическими и иммунофенотипическими методами. Более того, авторам удалось показать функцию дифференцированных мышечных клеток: их последовательное сокращение под действием стимулятора холинэргических рецепторов карбохола и последующую релаксацию добавкой конкурентного антагониста мускариновых холинэргических рецепторов атропина. Причем на фармацевтические препараты (карбохол и атропин) отвечали только окончательно дифференцированные в миогенном направлении клетки, но не их коммитированные предшественники.

Чрезвычайно важным на наш взгляд результатом этой работы явилась попытка авторов выяснить вопрос: является ли развитие мышечных клеток результатом селекции определенного типа клеток СВФ или дифференцировки СКЖТ? Для решения этого вопроса был проведен клональный анализ первичной суспензии СВФ. Конечным итогом работы было выделение и тестирование колоний, клетки которых были способны дифференцироваться как в адипогенном и остеогенном, так и в миогенном направлениях.

Дифференцировка СКЖТ в эктодермальных направлениях

В связи с тем, что жировая ткань, подобно строме КМ, является производным мезодермы, дифференцировка СКЖТ в мезодермальные линии вполне закономерна, однако выявлена также возможность дифференцировки этих клеток в эктодермальные линии, в частности в эпителиальные и нейрогенные клетки. Brzoska et al. [14] показали, что все трансретиневые кислоты могут индуцировать СКЖТ к экспрессии цитокератина 18 — маркера эпителиальных клеток.

Нейрогенную дифференцировку обычно устанавливают на основании появления клеток характерной морфологии, положительно окрашивающихся на β -тубулин нейроволокон. Zuk et al. [1] оценивали нейрогенную дифференцировку СКЖТ по экспрессии нестина — белка промежуточных филаментов, представленного на высоком уровне в НСК. Учитывая, что позитивное мечение нестином проявляют также миогенные, эндотелиальные и печеночные клетки, авторы работы [1] подтверждали нейрональную дифференцировку СКЖТ экспрессией двух специфических для нейральных клеток белков: NSE (нейронспецифическая энолаза) и NeuN (нейрональный белок ядер). Safford et al. [23] также сообщили, что СКЖТ мыши в определенных условиях способны дифференцироваться по нейрогенному пути с образованием типичных нейрональных и глиальных клеток. Романов и др. [20], заменившие сыворотку телят в среде культивирования СКЖТ на сыворотку пуповинной крови человека, наблюдали появление в клетках спонтанной (без предшествующей нейрональной индукции) экспрессии β -тубулина.

Дифференцировка СКЖТ в гепатоциты

Недавно появились результаты, свидетельствующие о возможности СКЖТ дифференцироваться в гепатоциты — производ-

ные эндодермального зародышевого листка [24]. Авторы провели двухэтапную гепатическую дифференцировку СКЖТ после предварительного культивирования в безсывороточной среде. На первом этапе клетки 7 дней культивировали в присутствии HGF, bFGF и никотинамида, а на втором — в среду внесили онкостатин М, дексаметазон, инсулин, трансферин, селен и альбумин. В ходе культивирования клетки изменяли фибробластоподобную морфологию на полигональную, что сопровождалось снижением экспрессии маркера стволовых клеток Thy-1. В течение 21 дня культивирования СКЖТ вырабатывали специфические для печени транскрипционные факторы (C/EBP β и HNF4 α) и экспрессировали маркеры гепатоцитов (альбумин и цитохром P-450).

Сравнение стромальных клеток жировой ткани и костного мозга

Решающим подтверждением наличия в жировой ткани стволовых клеток явилось получение из единичных СКЖТ клонов, обладающих мультилинейным потенциалом дифференцировки [1]. Многие исследователи отмечают большое сходство популяций СКЖТ и МСК КМ. В связи с этим был даже поставлен вопрос, не являются ли СКЖТ популяцией МСК, которая попадает в жировую ткань из периферической крови. Однако такое предположение кажется сомнительным, поскольку число МСК в строме КМ незначительно (примерно 1 МСК на 10^5 клеток) [24, 25] и, очевидно, еще ниже в периферической крови. Вряд ли такой низкий уровень может обеспечить относительно высокие уровни дифференцировки, наблюдаемые в работе со СКЖТ. В то же время исследование [7, 26] показали, что содержание МСК во фракции адгезивных клеток, извлеченных из жировой ткани, в 10–1000 раз выше, чем в соответствующей фракции КМ. Помимо этого существуют некоторые отличия популяций СКЖТ и МСК: во-первых, при культивировании МСК необходим скрининг сыворотки, тогда как для экспансии и дифференциации СКЖТ он не обязателен; во-вторых, МСК не подвергались хондрогенной или липогенной дифференцировке в тех условиях, которые были выдержаны в работе со СКЖТ [1].

В последнее время появились работы, в которых проведены прямые сравнительные исследования свойств МСК, изолированных из жировой ткани и костного мозга. Noel et al. [27] в системах *in vitro* и *in vivo*

показали, что СКЖТ и МСК КМ проявляют одинаковую способность к дифференцировке в остеогенном и хондрогенном направлениях. Эти результаты не полностью согласуются с работами [28,29]. Так, Vochev et al. [28], исследуя СКЖТ и МСК КМ в одинаковых условиях *in vitro*, установили, что они демонстрируют практически идентичные морфологические, иммунофенотипические, колониеобразующие свойства и способность к дифференцировке в адипогенном направлении. Однако СКЖТ проявляли меньший потенциал к дифференцировке в остеогенном направлении, чем МСК КМ [28]. Сходные данные о меньшем остеогенном потенциале СКЖТ были получены и в работе [29]. При этом остеогенный потенциал стромальных клеток костного мозга стимулировался мелатонином, а жировой ткани — подавлялся.

Обсуждая перспективу клинического применения СКЖТ, целесообразно привести результаты исследования [28], в котором установлено, что СКЖТ в значительно большей степени, чем МСК КМ, проявляют иммуномодулирующий эффект (ингибируют продукцию иммуноглобулинов и подавляют функцию В-лимфоцитов). Приведенные данные по сравнительному изучению стромальных клеток жировой ткани и костного мозга показывают, что СКЖТ можно рассматривать в качестве полноценной альтернативы МСК КМ для клинического применения. Это заключение подтверждается

клиническими наблюдениями. В частности, СКЖТ были успешно применены для лечения ректовагинальной фистулы у пациентки с болезнью Крона [30].

Следует отметить, что роль СКЖТ в организме не полностью ясна. Не известно, находятся ли они в дормантном состоянии с самых ранних стадий дифференцировки или пролиферируют в замедленном ритме, замедляя дегенерирующие или с нарушенной функцией клетки.

Таким образом, изначально гетерогенная стромально-васкулярная фракция жировой ткани содержит популяцию стромальных клеток, характеризующихся высокими адгезивными свойствами, фенотипом, характерным для МСК, и способностью к мультилинейной дифференцировке. Относительная простота и низкая травматичность процедуры получения жировой ткани, возможность выделения из нее значительного количества стволовых/прогениторных клеток, способных к селективному размножению в недифференцированном состоянии с последующей дифференцировкой в клетки различных тканей, позволяют рассматривать СКЖТ в качестве перспективного объекта для аутологических трансплантаций.

Работа выполнена в рамках программы «Новітні медико-біологічні проблеми та навколишнє середовище людини».

ЛИТЕРАТУРА

1. Zuk P. A., Zhu M., Ashjian P. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells // *Mol. Biol. Cell.* — 2002. — V. 13. — P. 4279–4295.
2. Zuk P. A., Zhu M., Mizuno H. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies // *Tissue Eng.* — 2001. — V. 7. — P. 211–218.
3. Петренко А. Ю., Петренко Ю. А., Скоробогатова Н. Г. и др. Стромальные клетки-предшественники жировой ткани: выделение, фенотипические и дифференцировочные свойства при монослойном культивировании // *Журн. АМН України.* — 2008. — Т. 14, №2. — С. 354–365.
4. Katz A. J., Tholpady A., Tholpady S. S. et al. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal cells // *Stem cells.* — 2005. — V. 23. — P. 412–423.
5. Lin Y., Tian W., Chen X. et al. Expression of exogenous or endogenous green fluorescent protein in adipose tissue-derived stromal cells during chondrogenic differentiation // *Mol. Cell Biochem.* — 2005. — V. 277. — P. 181–190.
6. Nathan S., Das De S., Thambyah A. et al. Cell-based therapy in the repair of osteochondral defects: a novel use for adipose tissue // *Tissue Eng.* — 2003. — V. 9. — P. 733–744.
7. Astori G., Vignati F., Bardelli S. et al. «In vitro» and multicolor phenotypic characterization of cell subpopulations identified in fresh human adipose tissue stromal vascular fraction and in the derived mesenchymal stem cells // *J. Transpl. Med.* — 2007. — V. 5, N1. — P. 55.
8. Трактюев Д. О., Парфенова Е. В., Ткачук В. А., Марч К. Л. Стромальные клетки жировой ткани — пластический тип клеток, обладающих высоким терапевтическим потенциалом // *Цитология.* — 2006. — Т. 48, № 2. — С. 83–93.
9. Kronenwentt R., Martin S., Haas R. The role of cytokines and adhesion molecules for mobilization of peripheral blood stem cells // *Stem Cells.* — 2000. — V. 18. — P. 320–330.

10. *Gronthos S., Franklin D. M., Leddy H. A. et al.* Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells // *J. Cell. Physiol.* — 2001. — V. 189. — P. 54–63.
11. *Planat-Benard V., Silvestre J. S., Cousin B. et al.* Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives // *Circulation.* — 2004. — V. 109. — P. 656–663.
12. *Cao Y., Sun Z., Liao L. et al.* Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2005. — V. 332. — P. 370–379.
13. *Fraser J.K., Wulur I., Alfonso Z., Hedrick M.H.* Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology // *Trends in Biotechnology.* — 2006. — V. 24, N4. — P. 150–154.
14. *Brzoska M., Geiger H., Gauer S. et al.* Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2005. — V. 330. — P. 142–150.
15. *Mitchel J.B., McIntoch K., Zvonic S. et al.* Immunophenotype of Human Adipose-Derived Cells: Temporal Changes in Stromal-Associated and Stem Cell-Associated Markers // *Stem Cells.* — 2006. — V. 24. — P. 376–385.
16. *Dicker A., Le Blanc K., Gaby A. et al.* Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue // *Exp. Cell Research.* — 2005. — V. 308. — P. 283–290.
17. *Erickson G.R., Gimble J.M., Franklin D.M. et al.* Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2002. — V. 290. — P. 763–769.
18. *James H.P., Li Li, Yee-Hong T. et al.* Comparative Study of the Ability of Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow, Periosteum, and Adipose Tissue in Treatment of Partial Growth Arrest in Rabbit // *Tissue Eng.* — 2005. — V. 11, N5/6. — P. 904–912.
19. *Gun I., Shin Y. W., Lee K. B.* Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells // *Osteoarthritis and Cartilage.* — 2005. — V. 13. — P. 845–853.
20. *Романов Ю.А., Даревская А.Н., Кабаева Н.В., Антонова О.А.* Выбор оптимальных условий культивирования мезенхимальных клеток-предшественников костного мозга и жировой ткани человека // *Клеточные технологии в биологии и медицине.* — 2006. — Т. 4. — С. 206–211.
21. *Di Rocco G., Iachininoto M.G., Tritarelli A. et al.* Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells // *J. Cell Sci.* — 2006. — V. 119, N14. — P. 2945–2952.
22. *Rodri'guez L.V., Alfonso Z., Zhang R. et al.* Clonogenic multipotent stem cells in human adipose tissue differentiate into functional smooth muscle cells // *PNAS.* — 2006. — V. 103, N32. — P. 12167–12172.
23. *Safford K.M., Safford S.D., Gimble J.M. et al.* Characterization of neuronal/glial differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells // *Exp. Neurol.* — 2004. — V. 187. — P. 319–328.
24. *Talens-Visconti R., Bonora A., Jover R. et al.* Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells // *World J. Gastroenterol.* — 2006. — V. 12, N36. — P. 5834–5845.
25. *Bruder S.P., Jaiswal N., Ricalton N.S. et al.* Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration // *Clin. Orthop. Rel. Res.* — 1998. — V. 355. — P. 247–256.
26. *Mosley T.A., Zhu M., Hedrick M.H.* Adipose-Derived Stem and Progenitor Cells as Fillers in Plastic and Reconstructive Surgery // *Plast. Reconstr. Surg.* — 2006. — V. 118, N3. — P. 121–128.
27. *Noel D., Caton D., Roche S. et al.* Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials // *Exp. Cell Res.* — 2008. — V. 314, N7. — P. 1575–1584.
28. *Bochev I., Elmadjian G., Kyurkchiev D. et al.* Mesenchymal stem cells from human bone marrow or adipose tissue differently modulate mitogen-stimulated B-cell immunoglobulin production in vitro // *Cell Biol. Int.* — 2008. — V. 32, N4. — P. 384–393.
29. *Zaminy A., Ragerdi Kashani I., Barbarestani M. et al.* Osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells: melatonin as a differentiation factor // *Iran Biomed. J.* — 2008. — V. 12, N3. — P. 133–141.
30. *Garcia-Olmo D., Garcia-Arranz M., Garcia L.G., et al.* Autologous stem cell transplantation for treatment of rectovaginal fistula in perianal Crohn's disease: a new cell-based therapy // *Int. J. Colorectal Dis.* — 2003. — V. 18. — P. 451–454.

СТОББУРОВІ КЛІТИНИ ІЗ ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ

*О. Ю. Петренко, Е. М. Іванов,
Ю. О. Петренко*

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України, Харків

E-mail: payua@yahoo.com

Завдяки низці унікальних властивостей і, зокрема, здатності диференціюватися у різні типи клітин сполучної тканини мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) привертають пильну увагу дослідників. Ці властивості визначають перспективність застосування МСК у біотехнології і регенеративній медицині. На цей час більшість робіт присвячено вивченню властивостей МСК, виділених із кісткового мозку дорослої людини. У стромі жирової тканини також виявлено популяцію стромальних стовбурових/прогеніторних клітин з мультилінійним потенціалом диференціювання. В огляді узагальнено досвід експериментальних робіт, присвячених виділенню стромальних клітин із жирової тканини і з'ясуванню їхніх біологічних властивостей. Стромальні клітини жирової тканини мають подібні до МСК кісткового мозку імунофенотип і здатність до мультилінійного диференціювання. Разом з тим описано деякі відмінності МСК, ізольованих із цих джерел.

Ключові слова: стовбурові клітини, жирова тканина, імунофенотип, диференціальний потенціал, кістковий мозок.

STEM CELLS OF ADIPOSE TISSUE

*O. Yu. Petrenko, E. M. Ivanov,
Yu. O. Petrenko*

Institute for problems of cryobiology
and cryomedicine of National Academy
of Sciences of Ukraine, Kharkiv

E-mail: payua@yahoo.com

Due to ability to differentiation into different cells of connective tissue mesenchymal stem cells (MSC) are promising object for biotechnology and regenerative medicine. The most studies on human MSC have been carried out on cells isolated from adult bone marrow. In stromal fraction of adipose tissue the cell population with multilineage differentiation potential has been revealed. The aim of the review is to describe the current state of isolation method and properties of MSC from adipose tissue. Stromal cells from adipose tissue possess of similar to bone marrow derived MSC immunophenotype and capacity to multilineage differentiation. At once some peculiar properties of MSC isolated from these sources are discussed.

Key words: stem cells, adipose tissue, immunophenotype, differentiation potential, bone marrow.

DOMINANT-NEGATIVE CONSTRUCTS OF HUMAN 6-PHOSPHOFRUCTO-2-KINASE/FRUCTOSE-2,6-BISPHOSPHATASE-3 AND -4: EFFECT ON THE EXPRESSION OF ENDOGENOUS 6-PHOSPHOFRUCTO-2-KINASE/FRUCTOSE-2,6-BISPHOSPHATASE mRNA

*D. O. Minchenko*¹ ¹Palladin Institute of Biochemistry of National Academy of Science of Ukraine, Kyiv
*A. Y. Bobarykina*¹
*O. O. Ratushna*¹ ²Research Center for Innovative Oncology of National Cancer Center Hospital East, Kashiwa, Japan
*R. Y. Marunych*¹,
*K. Tsuchihara*²
*M. Moenner*³ ³INSERM U920 Molecular Mechanisms of Angiogenesis Laboratory, University Bordeaux 1, Talence, France
*J. Caro*⁴
*H. Esumi*²
O. H. Minchenko^{1,2,*} ⁴Department of Medicine, Jefferson Medical College of Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA, USA
*Foreign Research Fellow of the Foundation for Promotion of Cancer Research, Tokyo

E-mail: ominchenko@yahoo.com

Expression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB), a key regulatory enzyme of glycolysis, is significantly increased in different malignant tumors provides a potential mechanism of enhanced glycolysis and cancer cell proliferation. We created dominant-negative constructs of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 and -4 (dnPFKFB-3 and dnPFKFB-4) cDNA for suppression of strongly enhanced expression endogenous PFKFB-3 and PFKFB-4. We introduce point mutation in ATP-binding domain of 6-phosphofructo-2-kinase part of PFKFB-3 as well as PFKFB-4 cDNA for suppression of 6-phosphofructo-2-kinase activity in the products of dnPFKFB-3 and dnPFKFB-4 expression. Cancer cells were stable transfected with these dominant-negative constructs for suppression of endogenous PFKFB-3 and PFKFB-4 expression and cell proliferation. We have shown that PFKFB-3 expression in pancreatic cancer cell line Panc1, stable transfected by dnPFKFB-3, was significantly reduced in normal as well as in hypoxic conditions. Pancreatic cancer cells proliferation, stable transfected by dnPFKFB-3 or dnPFKFB-4, was also reduced. Results of this investigation demonstrate possibility to apply the dominant-negative constructs of PFKFB-3 and PFKFB-4 for suppression of glycolysis and tumor cells proliferation via reduction of endogenous PFKFB expression.

Key words: PFKFB-4 mRNA, PFKFB-3 mRNA, dominant-negative constructs, cancer cells.

The homodimeric bifunctional enzyme 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase [6-phosphofructo-2-kinase (EC 2.7.1.105); fructose-2,6-bisphosphatase (EC 3.1.3.46)] has both kinase and bisphosphatase activities and catalyses the synthesis and degradation of fructose-2,6-bisphosphate, a signal molecule that control glycolysis [1–4]. Moreover, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB) is a key

enzyme in the regulation of glycolysis as well as gluconeogenesis in normal and different pathological conditions, in particular in malignant tumors [4–10]. X-ray crystallography shown that 6-phosphofructo-2-kinase domain has the same fold as adenylate kinase [11]. The fructose-2,6-bisphosphatase domain of the enzyme subunit bears sequence, mechanistic and structural similarity to the histidine phosphatase family of enzymes, including

the acid phosphatases and phosphoglycerate mutases [5, 11]. Therefore, fructose-2,6-bisphosphate plays a unique role in the control of glucose homeostasis by allowing the liver to switch from glycolysis to gluconeogenesis [4, 5, 7]. There are four 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase isoenzymes (PFKFB-1, PFKFB-2, PFKFB-3 and PFKFB-4) in mammals, each coded by a different gene (*pfkfb1*, *pfkfb2*, *pfkfb3* and *pfkfb4*). Moreover, these genes express several isoforms of each isoenzyme with different kinetic and regulatory properties [4, 5, 12, 13]. It was shown that different tissues as well as cancer cell lines express more than one isoform [13–16]. This multiple expression of PFKFB isozymes with different properties suggests that each isoenzyme can play a specific role in the regulation of glycolysis in some physiologic and different pathophysiological conditions.

Overexpression of PFKFB isozymes as well as enhanced glycolysis is observed in most malignant tumors and in different cancer cell lines and significantly increases in hypoxic conditions [13–19]. The metabolism within a solid tumor is significantly different from that of the surrounding normal tissue. Tumors growing under conditions of normal oxygen tension show elevated glycolytic rates, produce high levels of lactate and pyruvate (the Warburg effect) that correlate with the increased expression of glycolytic enzymes and glucose transporters via HIF-1 dependent mechanism [1–4, 20–25]. In tumor over 50% of the cellular energy is produced by glycolysis with the remainder being generated at the mitochondria. The reliance of tumor cells on glycolysis for energy production causes them to consume more glucose because of the low efficiency of glycolysis in generating ATP [23]. Thus, glycolysis is essential for tumor survival and spread. Moreover, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase has a key role for the neoplastic transformation and provide rationale for the development of agents that selectively inhibit the PFKFB-3 enzyme as antineoplastic agents. Moreover, hypoxia is a common feature of many cancers and has been linked to malignant transformation, metastasis, and treatment resistance [23–27]. Most of tumors are subjected to hypoxic conditions due to the abnormal vasculature that supply them with oxygen and nutrients. Transcription complex HIF-1 is overexpressed in a variety of tumors and its expression appears to correlate with poor prognosis and responses to chemo- or radio-

therapy. The most PFKFB isozymes are contribute to *de novo* nucleic acid synthesis in tumor cells, are uniformly increased in the malignant tissues and provide a potential mechanism to explain the apparent coupling of enhanced glycolysis and cell proliferation [6, 7, 17–19, 28, 29].

Previously, we have shown that the *pfkfb4* gene is overexpressed in several cancer cell lines and is highly induced by hypoxia via HIF-1 dependent mechanism [14].

The *pfkfb3* gene encoded 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase isozyme ubiquitously expressed in different organs and tumor cells [8, 13–15, 17–19]. Several alternative splice variants of PFKFB-3 mRNA with variable C-terminus were identified in human brain and different rat and mouse tissues [30–35]. There were isolated eight isoforms of PFKFB-3 mRNA from brain and some other tissues. The cDNA sequences encoding the 5'-untranslated region, the amino-terminal domain, and the catalytic core domain were identical among all these isoforms. However, heterogeneity of the carboxyl-terminus was found by sequence analysis.

Many genes whose expression is regulated by hypoxia are overexpressed in malignant tissues and cell lines and contain HIF-1 binding site (hypoxia-responsible element, HRE) [14, 16, 36–38]. HRE was recently identified in *pfkfb3* and *pfkfb4* genes [14, 39–41]. Transcription factor HIF is central in coordinating many of the transcriptional adaptations to hypoxia and a necessary mediator of the hypoxic effect as well as Pasteur effect in mammalian cells and Warburg effect in tumors [29, 37, 42, 43]. Thus, targeting PFKFB enzymes, either directly or through inhibition of HIF-1, appears as a promising approach for the treatment of certain tumors.

Despite importance of PFKFB-3 and PFKFB-4 in the regulation of glycolysis, the dominant-negative constructs of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 and -4 cDNA were not been created and used yet for suppression of glycolysis. In this work we have created dnPFKFB-3 and dnPFKFB-4 constructs and studied the expression of endogenous PFKFB-3 and PFKFB-4 mRNA in pancreatic cancer cells stable transfected with these constructs.

Materials and methods

Cell lines. Human pancreatic cancer cell lines Pank1 and PSN-1 were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC,

USA) and grown according to the supplier's protocols. The cells were incubated at 37 °C before harvesting under normoxic (21% oxygen and 5% carbon dioxide) or hypoxic conditions, which were modulated by dimethylloxalylglycine (1 mM during 6 hours) [15].

RNA isolation. Total RNA was extracted using Trizol reagent according to the manufacturer's protocols (Invitrogen, USA). RNA pellet was washed with 75% ethanol, dissolved in nuclease-free water and used for reverse transcription.

Synthesis and cloning of PFKFB-3 and PFKFB-4 cDNA. The human PFKFB-3 and PFKFB-4 cDNA was synthesized by RT-PCR using total RNA from human pancreatic cancer cell lines Pank1 and oligo(dT). For first-strand cDNA synthesis was used Sensiscript RT Kit (QIAGEN, Germany). Human PFKFB-3 PCR amplification was performed with the following oligonucleotides: 5'-GATGCCGTTG-GAACTGACGC-3' (forward primer) and 3'-CTGAGGCAGACGTGTCGGTT-5' (reverse primer) using HotStarTaq Master Mix Kit (QIAGEN). These oligonucleotides correspond to nucleotide sequences 329–348 and 1889–1908 of human PFKFB-3 mRNA (GenBank accession number NM_004566). The amplification of human PFKFB-4 was performed with the following oligonucleotides: 5'-GATGGCGTCC-CCACGGGAATTG -3' (forward primer) and 3'-GCTCACCAGTGACCATGTTC-5' (reverse primer) using HotStarTaq Master Mix Kit (QIAGEN). These oligonucleotides correspond to nucleotide sequences 17–38 and 1416–11435 of human PFKFB-3 mRNA (GenBank accession number NM_004566). The PFKFB-3 and PFKFB-4 cDNA were cloned into pCRII-TOPO

(Invitrogen, USA) vector as described previously [14] and used for creation of dominant-negative constructs (dnPFKFB-3 and dnPFKFB-4). These constructs were verified by sequencing the insert in the plasmid. Sequence analysis was performed using ABI Prism (Model 3100, version 3.7). The dnPFKFB-3 and dnPFKFB-4 cDNA were recloned into pcDNA3.1 (Invitrogen, USA) and used for transfection assays.

The expression of PFKFB-3 mRNA in Panc1 cells was examined by ribonuclease protection assays as described previously [15, 46], but probes corresponds to 3'-region (3193–3540; GenBank accession number NM_004566). The 18S rRNA antisense probe was used to ensure equal loading of the sample of total RNA. The expression of PFKFB-3 and PFKFB-4 mRNA in Pst-1 cells was examined by real time RCR analysis assays. Quantitative PCR was performed on «Stratagene Mx 3000P cyler», using SYBRGreen Mix as described previously [47]. Reaction was performed in triplicate. Analysis of quantitative PCR was performed using special computer program «Differential expression calculator» and statistic analysis — in Excel program.

Results and Discussion

We synthesized the human PFKFB-3 and PFKFB-4 cDNA using total RNA from human pancreatic cancer cell line Panc1. Both cDNA were amplified and cloned into pCRII-TOPO vector. For inactivation of 6-phosphofructo-2-kinase we changed four nucleotide residues in domain «A» using special primers. As shown in Fig. 1 and 2, this nucleotide replacement in

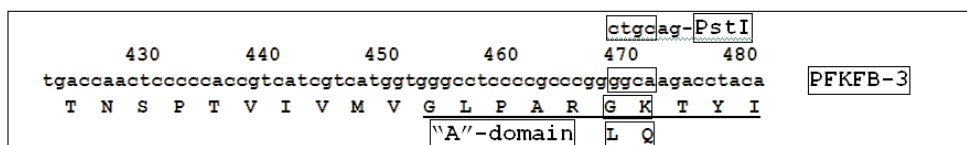


Fig. 1. Fragment of 6-phosphofructo-2-kinase part of human PFKFB-3 cDNA (GenBank accession number NM_004566), containing domain «A» (underlined). Four nucleotide residues (GGCA) into domain «A» were replaced by CTGC. These changes create new restriction site (PstI) and replace two amino acids residues: G and K

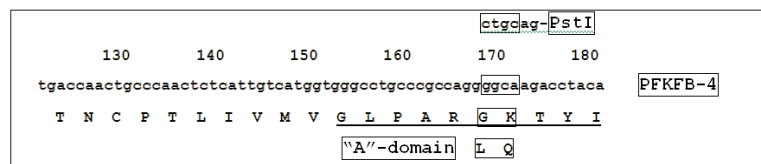


Fig. 2. Fragment of 6-phosphofructo-2-kinase part of human PFKFB-4 cDNA (GenBank accession number NM_004567), containing domain «A» (underlined). Four nucleotide residues (GGCA) into domain «A» were replaced by CTGC. These changes create new restriction site (PstI) and replace two amino acids residues: G and K

PFKFB-3 and PFKFB-4 creates new restriction site (PstI) and changes two amino acids residues: G to L and K to Q. These changes should suppress the 6-phosphofructo-2-kinase activity because K residue is crucial for keeping kinase activity. These modified PFKFB-3 and PFKFB-4 cDNA represent dominant-negative variants in respect to 6-phosphofructo-2-kinase activity.

We recloned modified human PFKFB-3 and PFKFB-4 cDNA into eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+) using EcoRI and XbaI restriction nuclease sites. Structure of dominant-negative construct of PFKFB-3 (dnPFKFB-3) shown on Fig. 3. Same structure has dnPFKFB-4. Both dominant-negative constructs were used for transfection experiments. We received clone of Panc1 cells stable transfected by dnPFKFB-3.

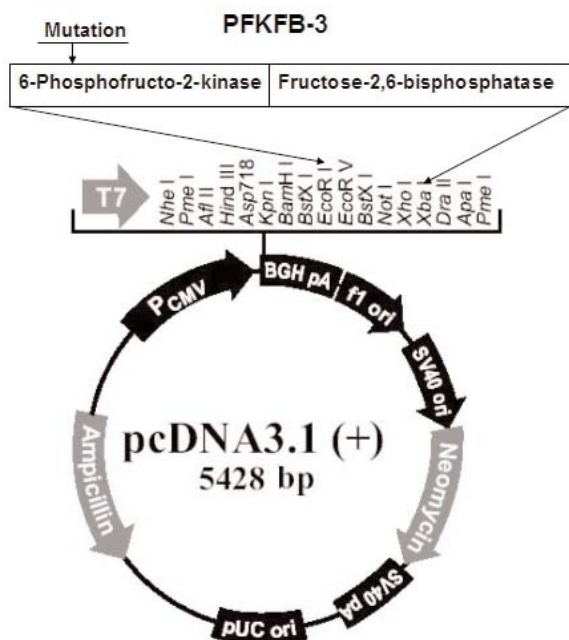


Fig. 3. Dominant-negative plasmid construction of human PFKFB-3 cDNA, which contains PFKFB-3 cDNA with modified 6-phosphofructo-2-kinase domain «A» into pcDNA3.1(+) vector

The effect of PFKFB-3 dominant-negative construct on the expression of endogenous PFKFB-3 mRNA is shown in Fig. 4. For this analysis was used 3'-terminus of PFKFB-3 mRNA because dnPFKFB-3 construct does not contains this region of PFKFB-3. Pancreatic cancer cells, stable transfected by dnPFKFB-3, have significantly lower expression of endogenous PFKFB-3 mRNA as in normoxic and hypoxic conditions, which were modulated by dimethylxalylglycine (Fig. 4 and 5).

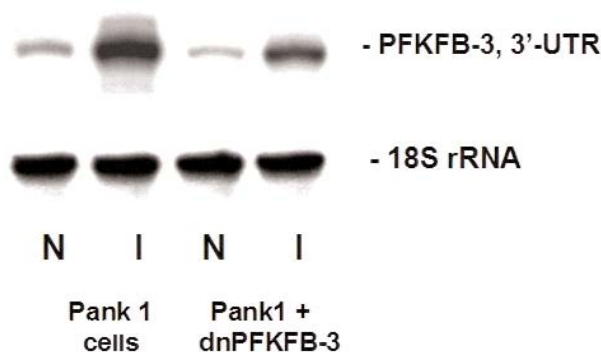


Fig. 4. Endogenous PFKFB-3 mRNA expression in pancreatic carcinoma cell line Panc1 stable transfected by pcDNA3.1(+) vector (Panc1 cells) and stable transfected by dnPFKFB-3 (Panc1 + dnPFKFB-3) in normoxic (N) and hypoxic conditions (I), which were modulated by dimethylxalylglycine (1 mM during 6 hours). The 18S rRNA antisense probe was used to ensure equal loading of the sample of total RNA

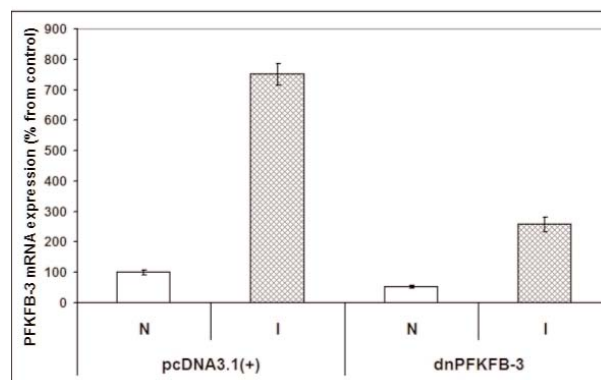


Fig. 5. Quantification of endogenous PFKFB-3 mRNA expression in pancreatic carcinoma cell line Panc1 stable transfected by pcDNA3.1(+) vector or dnPFKFB-3 in normoxic (N) and hypoxic (I) conditions; n = 5

PFKFB-3 and PFKFB-4 mRNA expression was also measured in other pancreatic carcinoma cell line PSN-1 stable transfected by pcDNA3.1(+) vector, dnPFKFB-3 or dnPFKFB-4. Results of these experiments are shown on Fig. 6. PSN-1 cells transfected with dnPFKFB-3 shown lower level of endogenous PFKFB-3 mRNA expression. Moreover, the expression of PFKFB-4 mRNA in these cells also decreased. It is possible that there is some interaction between different PFKFB genes in molecular mechanisms of PFKFB suppression by dominant-negative constructs. Same effect has dnPFKFB-4 on the of endogenous PFKFB-4 and PFKFB-3 mRNA.

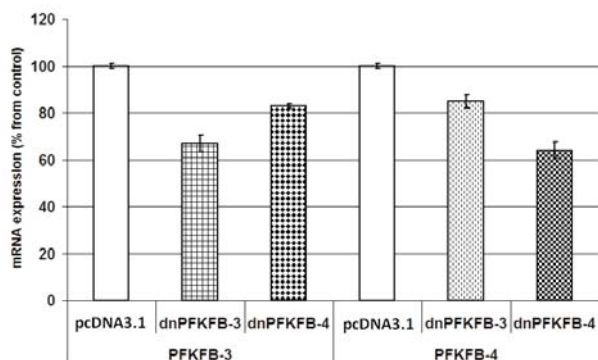


Fig. 6. Endogenous PFKFB-3 and PFKFB-4 mRNA expression in pancreatic carcinoma cell line PSN-1 stable transfected with pcDNA3.1(+) vector, dnPFKFB-3 and dnPFKFB-4

LITERATURE

- Okar D. A., Lange A. J. Fructose-2,6-bisphosphate and control of carbohydrate metabolism in eukaryotes // *Biofactors*. — 1999. — V. 10, N1. — P. 1–14.
- Kawaguchi T., Veech R. L., Uyeda K. Regulation of energy metabolism in macrophages during hypoxia. Roles of fructose 2,6-bisphosphate and ribose 1,5-bisphosphate // *J. Biol. Chem.* — 2001. — V. 276, N30. — P. 28554 — 28561.
- Rousseau G. G., Hue L. Mammalian 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: a bifunctional enzyme that control glycolysis // *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* — 1993. — V. 45. — P. 99 — 127.
- Okar D. A., Manzano A., Navarro-Sabate A. et al. PFK-2/FBPase-2: maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate // *Trends Biochem. Sci.* — 2001. — V. 26, N1. — P. 30 — 35.
- Rider M. H., Bertrand L., Vertommen D. et al. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis // *Biochem. J.* — 2004. — V. 381, Pt. 3. — P. 561–579.
- Atsumi T., Chesney J., Metz C. et al. High expression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (iPFK-2; PFKFB3) in human cancers // *Cancer Res.* — 2002. — V. 62, N20. — P. 5881–5887.
- Atsumi T., Nishio T., Niwa H. et al. Expression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase/PFKFB3 isoforms in adipocytes and their potential role in glycolytic regulation // *Diabetes*. — 2005. — V. 54, N12. — P. 3349–3357.
- Chesney J. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase and tumor cell glycolysis // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. — 2006. — V. 9, N5. — P. 535–539.
- Bando H., Atsumi T., Nishio T. et al. Phosphorylation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase/PFKFB3 family of glycolytic regulators in human cancer // *Clin. Cancer Res.* 2005. — V. 11, N16 — P. 5784–5792.
- Calvo M. N., Bartrons R., Castano E. et al. PFKFB3 gene silencing decreases glycolysis, induces cell-cycle delay and inhibits anchorage-independent growth in HeLa cells // *FEBS Lett.* — 2006. — V. 580, N13. — P. 3308–3314.
- Bertrand L., Vertommen D., Depiereux E. et al. Modelling the 2-kinase domain of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase on adenylate kinase // *Biochem. J.* — 1997. — V. 321, Pt. 3. — P. 615–621.
- Sakakibara R., Okudaira T., Fujiwara K. et al. Tissue distribution of placenta-type 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1999. — V. 257, N1. — P. 177–181.
- Minchenko O., Opentanova I., Caro J. Hypoxic regulation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 gene family (PFKFB-1-4) expression in vivo // *FEBS Lett.* — 2003. — V. 554, N3. — P. 264–270.
- Minchenko O. H., Opentanova I. L., Minchenko D. O. et al. Hypoxia induces transcription of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4 gene via hypoxia-inducible factor-1alpha activation // *Ibid.* — 2004. — V. 576, N1. — P. 14–20.
- Minchenko A. G., Leshchinsky I., Opentanova I. et al. Hypoxia-inducible factor-1-mediated expression of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB3) gene // *J. Biol. Chem.* — 2002. — V. 277, N8. — P. 6183–6187.
- Mykhalchenko V. G., Kovtun O. O., Bobarykina A. Y., Minchenko O. H. Molecular mechanisms of the regulation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase genes expression in hypoxia // *Bulletin Taras Shevchenko Kyiv National University*. — 2006. — Issue 11. — P. 18–24.
- Minchenko O. H., Ogura T., Opentanova I. L. et al. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene family overexpression in the lung tumor // *Укр. біохім. журн.* — 2005. — Т. 77, №6. — С. 46–50.
- Bobarykina A. Y., Minchenko D. O., Opentanova I. L. et al. Hypoxic regulation of PFKFB-3 and PFKFB-4 gene expression in gastric and pancreatic cancer cell lines and expression of PFKFB genes in gastric cancers // *Acta Biochim. Pol.* — 2006. — V. 53, N4. — P. 789–799.
- Minchenko O. H., Ochiai A., Opentanova I. L. et al. Overexpression of 6-phosphofructo-2-

- kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 in the human breast and colon malignant tumors // *Biochimie*. — 2005. — V. 87, N11. — P. 1005–1010.
20. *Warburg O.* On respiratory impairment in cancer cells // *Science*. — 1956. — V. 123, N3191. — P. 309–314.
 21. *Hopfl G., Ogunshola O., Gassmann M.* HIFs and tumors — causes and consequences // *Am. J. Physiol.* — 2004. — V. 286, N4. — P. R608–R623.
 22. *Chesney J., Mitchell R., Benigni F. et al.* An inducible gene product for 6-phosphofructo-2-kinase with an AU-rich instability element: Role in tumor cell glycolysis and the Warburg effect // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1999. — V. 96, N6. — P. 3047–3052.
 23. *Denko N. C.* Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumor // *Nat. Rev. Cancer*. — 2008. — V. 8. — P. 705–713.
 24. *Hockel M., Vaupel P.* Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects // *J. Natl. Cancer Inst.* — 2001. — V. 93, N4. — P. 266–276.
 25. *Lu H., Forbes R. A., Verma A.* Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis // *J. Biol. Chem.* — 2002. — V. 277, N26. — P. 23111–23115.
 26. *Bartrons R., Caro J.* Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg's effect // *J. Bioenerg. Biomembr.* — 2007. — V. 39, N3. — P. 223–229.
 27. *Airley R. E., Mobasher A.* Hypoxic regulation of glucose transport, anaerobic metabolism and angiogenesis in cancer: novel pathways and targets for anticancer therapeutics // *Chemotherapy*. — 2007. — V. 53, N4. — P. 233–256.
 28. *Бобарикіна А. Ю., Мінченко Д. О., Опентанова І. Л. та ін.* Експресія мРНК HIF-1 α , HIF-2 α та VHL у різних лініях клітин при гіпоксії // *Укр. біохім. журн.* — 2006. — Т. 78, №2. — С. 49–59.
 29. *Hirata T., Watanabe M., Miura S. et al.* Inhibition of tumor cell growth by a specific 6-phosphofructo-2-kinase inhibitor, N-bromoacetyethanolamine phosphate, and its analogues // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* — 2000. — V. 64, N10. — P. 2047–2052.
 30. *Kessler R., Eschrich K.* Splice isoforms of ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in human brain // *Mol. Brain Res.* — 2001. — V. 87, N2. — P. 190–195.
 31. *Watanabe F., Sakai A., Furuya E.* Novel isoforms of rat brain fructose 2-phospho 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase are generated by tissue-specific alternative splicing // *J. Neurochem.* — 1997. — V. 69, N1. — P. 1–9.
 32. *Watanabe F., Furuya E.* Tissue-specific alternative splicing of rat brain fructose 6-phosphate 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase // *FEBS Lett.* — 1999. — V. 458, N1. — P. 304–308.
 33. *Mykhalchenko V. G., Minchenko D. O., Tsuchihara K. et al.* Expression of mouse 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 mRNA alternative splice variants in hypoxia // *Укр. біохім. журн.* — 2008. — Т. 80, №1. — С. 19–25.
 34. *Minchenko D. O., Tsuchihara K., Komisarlenko S. V. et al.* Unique alternative splice variants of mouse PFKFB-3 mRNA: tissue specific expression // *Scientific Bulletin National O.O. Bohomoletz Medical University*. — 2008. — №1. — P. 72–78.
 35. *Minchenko O. H., Opentanova I. L., Ochiai A. et al.* Splice isoform of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4: expression and hypoxic regulation. *Mol. & Cell. Biochem.* — 2005. — V. 280, N1–2. — P. 227–234.
 36. *Wykoff C. C., Pugh C. W., Maxwell P. H. et al.* The HIF pathway: implications for patterns of gene expression in cancer // *Novartis Found Symp.* — 2001. — V. 240. — P. 212–225.
 37. *Wenger R. H.* Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression // *FASEB J.* — 2002. — V. 16, N10. — P. 1151–1162.
 38. *Minchenko A. G., Caro J.* Regulation of endothelin-1 gene expression in human microvascular endothelial cells by hypoxia and cobalt: role of hypoxia responsible element // *Mol. & Cell. Biochem.* — 2000. — V. 208. — P. 53–62.
 39. *Minchenko O. H., Opentanova I. L., Ogura T. et al.* Expression and hypoxia-responsiveness of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4 in the mammary gland malignant cell lines // *Acta Biochim. Pol.* — 2005. — V. 52, N4. — P. 881–888.
 40. *Fukasawa M., Tsuchiya T., Takayama E. et al.* Identification and characterization of the hypoxia-responsive element of the human placental 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene // *J. Biochem.* — 2004. — V. 136, N3. — P. 273–277.
 41. *Obach M., Navarro-Sabate A., Caro J. et al.* 6-Phosphofructo-2-kinase (pfkfb3) gene promoter contains hypoxia-inducible factor-1 binding sites necessary for transactivation in response to hypoxia // *J. Biol. Chem.* — 2004. — V. 279, N51. — P. 53562–53570.
 42. *Walenta S., Salameh A., Lyng H. et al.* Correlation of high lactate levels in head and neck tumors with incidence of metastasis // *Am. J. Pathol.* — 1997. — V. 150, N3. — P. 409–415.
 43. *Chen J., Zhao S., Nakada K. et al.* Dominant-negative hypoxia-inducible factor-1 alpha

- reduces tumorigenicity of pancreatic cancer cells through the suppression of glucose metabolism // *Am. J. Pathol.* — 2003. — V. 162, N4. — P. 1283–1291.
44. *Ryan H. E., Poloni M., McNulty W. et al.* Hypoxia-inducible factor-1 is a positive factor in solid tumor growth // *Cancer Res.* — 2000. — V. 60, N15. — P. 4010–4015.
45. *Minchenko O. H., Ogura T., Opentanova I. L. et al.* 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene family overexpression in the lung tumor // *Укр. біохім. журн.* — 2005. — Т. 77, №6. — С. 46–50.
46. *Minchenko O. H., Opentanova I. L., Ochiai A. et al.* Splice isoform of 6-phosphofructo-2-kinase/ fructose-2,6-bisphosphatase-4: expression and hypoxic regulation // *Mol. & Cell. Biochem.* — 2005. — V. 280. — N1–2. — P. 227–234.
47. *Mykhalchenko V. G., Tsuchihara K., Minchenko D. O. et al.* 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase mRNA expression in streptozotocin-diabetic rats // *Biopolymers & Cell.* — 2008. — V. 24, N3. — P. 260–266.

ДОМІНАНТНЕГАТИВНІ КОНСТРУКЦІЇ 6-ФОСФОФРУКТО-2-КІНАЗИ/ФРУКТОЗО-2,6-БІСФОСФАТАЗИ-3 ТА -4 ЛЮДИНИ: ВПЛИВ НА ЕКСПРЕСІЮ ЕНДОГЕННИХ мРНК 6-ФОСФОФРУКТО-2-КІНАЗИ/ФРУКТОЗО-2,6-БІСФОСФАТАЗ

Д. О. Мінченко¹
 А. Ю. Бобарикіна¹
 О. О. Ратушина¹
 Р. Ю. Маруніч¹
 К. Тсучігара²
 М. Моне³
 Х. Каро⁴
 Г. Есумі²
 О. Г. Мінченко^{1, 2}

¹Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна
 НАН України, Київ

²Науково-дослідний центр інноваційної
 онкології Східного госпіталю
 Національного онкологічного центру Японії,
 Кашіва, Японія

³INSERM U920 Лабораторія молекулярних
 механізмів ангиогенезу Університету Бордо 1,
 Таленс, Франція

⁴Відділ медицини Джеферсон медичного
 коледжу Томас Джеферсон Університету,
 Філадельфія, США

E-mail: ominchenko@yahoo.com

Експресія 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази (РФКФВ), ключового регуляторного ензиму гліколізу, різко зростає в різних злоякісних пухлинах, що розкриває можливий механізм посиленого гліколізу в ракових клітинах та їх проліферації. Ми створили домінантнегативні конструкції кДНК 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-3 та -4 (dnРФКФВ-3 та dnРФКФВ-4) для пригнічення посиленої експресії ендогенних РФКФВ-3 та РФКФВ-4. Для цього вводили точкові мутації в АТР-зв'язувальний домен

6-фосфофрукто-2-кінази як РФКФВ-3, так і РФКФВ-4 кДНК для пригнічення 6-фосфофрукто-2-кіназної активності у продуктах експресії цих конструкцій. Проводили трансфекцію ракових клітин цими домінантнегативними конструкціями для пригнічення експресії ендогенних РФКФВ-3 і РФКФВ-4 та проліферації клітин. Встановлено, що експресія РФКФВ-3 в клітинах карциноми підшлункової залози лінії Panc1, стабільно трансфєкованих dnРФКФВ-3, знижується як у нормальних умовах, так і за гіпоксії. У клітинах з посиленою експресією dnРФКФВ-4 спостерігали пригнічення ендогенних як РФКФВ-4, так і РФКФВ-3. Проліферація клітин карциноми підшлункової залози, стабільно трансфєкованих як dnРФКФВ-3, так і dnРФКФВ-4, знижується. Результати цих досліджень показують можливість використання домінантнегативних конструкцій РФКФВ-3 та РФКФВ-4 для зменшення інтенсивності гліколізу та проліферації ракових клітин шляхом зниження експресії ендогенних РФКФВ.

Ключові слова: РФКФВ-4 мРНК, РФКФВ-3 мРНК, домінантнегативні конструкції, ракові клітини.

**ДОМИНАНТНЕГАТИВНЫЕ
КОНСТРУКЦИИ 6-ФОСФОФРУКТО-2-
КИНАЗЫ/ФРУКТОЗО-2,6-БИСФОСФАТАЗЫ-3
И -4 ЧЕЛОВЕКА:
ВЛИЯНИЕ НА ЭКСПРЕССИЮ
ЭНДОГЕННЫХ мРНК 6-ФОСФОФРУКТО-2-
КИНАЗЫ/ФРУКТОЗО-2,6-БИСФОСФАТАЗ**

*Д. А. Минченко¹
А. Ю. Бобарыкина¹
О. А. Ратушина¹
Р. Ю. Марунич¹
К. Тсучигара²
М. Моне³
Х. Каро⁴
Г. Есуми²
А. Г. Минченко^{1,2}*

¹Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев

²Научно-исследовательский центр инновационной онкологии Восточного госпиталя Национального онкологического центра Японии, Кашива, Япония

³INSERM U920 Лаборатория молекулярных механизмов ангиогенеза Университета Бордо 1, Таленс, Франция

⁴Отдел медицины Джефферсон медицинского колледжа Томас Джефферсон Университета, Филадельфия, США

E-mail: ominchenko@yahoo.com

Экспрессия 6-фосфофрукто-2-киназы/фруктозо-2,6-бисфосфатазы (PFKFB), ключевого регуляторного фермента гликолиза, резко возрастает в различных злокачественных опухолях, что раскрывает возможный механизм усиленного гликолиза в раковых клетках и их пролиферации. Мы создали доминантнегативные конструкции кДНК 6-фосфофрукто-2-киназы/фруктозо-2,6-бисфосфатазы-3 и -4 (dnPFKFB-3 и dnPFKFB-4) для угнетения усиленной экспрессии эндогенных PFKFB-3

и PFKFB-4. Для этого вводили точечные мутации в АТР-связывающий домен 6-фосфофрукто-2-киназы как PFKFB-3, так и PFKFB-4 для угнетения 6-фосфофрукто-2-киназной активности в продуктах экспрессии этих конструкций. Проводили трансфекцию раковых клеток этими доминантнегативными конструкциями для угнетения экспрессии эндогенных PFKFB-3, а также пролиферации клеток. Установлено, что экспрессия PFKFB-3 в клетках карциномы поджелудочной железы линии Panc1, стабильно трансфицированных dnPFKFB-3, снижается как в нормальных условиях, так и при гипоксии. В клетках с усиленной экспрессией dnPFKFB-4 наблюдали угнетение эндогенных как PFKFB-4, так и PFKFB-3. Пролиферация клеток карциномы поджелудочной железы, стабильно трансфицированных как dnPFKFB-3, так и dnPFKFB-4, снижается. Результаты этих исследований показывают возможность использования доминантнегативных конструкций PFKFB-3 и PFKFB-4 для уменьшения интенсивности гликолиза и пролиферации раковых клеток путем снижения экспрессии эндогенных PFKFB.

Ключевые слова: PFKFB-3 и PFKFB-4 мРНК, доминант-негативные конструкции, раковые клетки.

УДК 615.222:581.143.6

МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ УНГЕРНІЇ ВІКТОРА (*UNGERNIA VICTORIS* VVED. EX ARTJUSHENKO)

В. А. Кунах¹Л. П. Можилевська¹О. М. Бублик¹І. В. Колоніна²В. І. Музика²¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ² ТОВ «Унгернія», Москва, Росія

E-mail: kunakh@imbg.org.ua

Для рідкісної лікарської рослини унгернія Віктора (*Ungernia victoris* Vved. ex Artjushenko) уперше розроблено умови мікроклонального розмноження як прямою регенерацією із фрагментів лусок цибулини, так й індукуванням регенерації із калюсних тканин, що їх тривалий час вирощували *in vitro*. Підібрано також умови мультиплікації та вирощування *in vitro* одержаних мікроцибулин-регенерантів.

Ключові слова: *Ungernia victoris*, мікроклональне розмноження, пряма регенерація рослин, індукування регенерації рослин.

Багаторічна цибулинна рослина унгернія Віктора (*Ungernia victoris* Vved. ex Artjushenko) — ендемічний вид родини амарилісових *Amaryllidaceae* з вузьким ареалом. Розповсюджена лише на Гіссарському хребті та його південних схилах (Таджикістан). Наразі цей вид є одним із небагатьох джерел важливого для медицини алкалоїду галантаміну, який має, зокрема, антихолінестеразну активність, а також деяких інших цінних ізохінолінових алкалоїдів, зокрема лікорину [1]. Природні запаси унгернії обмежені [2], а її інтродукція, так само як й інших представників родини амарилісових, що накопичують галантамін, не мала успіху [3].

Альтернативним джерелом сировини для отримання галантаміну, лікорину й інших важливих для медицини алкалоїдів унгернії може бути біомаса культивованих *in vitro* клітин, тканин та органів рослини. Проте в культурі тканин алкалоїди унгернії або не накопичуються, або ж кількість їх є незначною [4]. Перспективною може бути органогенна культура тканин або ж культура органів — зазвичай такі культури краще синтезують і накопичують вторинні метаболіти порівняно з неорганізованими калюсними та суспензійними культурами з незначним рівнем диференціації клітин [4].

Відомі способи мікроклонального розмноження, що їх розроблено для багатьох видів рослин [5], проте для унгернії Віктора таких даних до початку наших робіт не було.

У даній роботі наведено результати багаторічних досліджень, метою яких було вивчити можливість мікроклонального розмноження унгернії Віктора як прямою регенерацією, так й індукцією регенерації у пасивованих калюсних тканинах. Розроблення методу прямої регенерації є важливим для збереження генофонду цієї рідкісної рослини, а методу індукції регенерації із культивованих клітин — також для отримання нових форм рослин методами клітинної селекції і, можливо, для створення технології вирощування клітинної біомаси як джерела важливих для медицини алкалоїдів унгернії.

Матеріали і методи

Вихідним матеріалом слугували цибулини унгернії масою 110–165 г. Усього для введення у культуру *in vitro* використали 10 цибулин, зібраних у різні роки на південних схилах Гіссарського хребта (Таджикістан).

Цибулини, що перебували у стадії спокою, очищали від зовнішніх сухих лусок, стерилізували загальноприйнятими методами

[5], у стерильних умовах цибулину розділяли на окремі луски. Для експериментів використовували базальні (нижні) частини цибулин (приблизно 2/3 лусок), які нарізали на фрагменти розміром 0,5–1х1 см і висаджували на живильні середовища різного складу.

Усього було випробувано понад 50 варіантів живильних середовищ з мінеральною основою за Мурасіге–Скугом, Лінсмайер–Скугом, Гамборга В5, Ерікссоном, Уайтом [5–7], Воллосовичем та ін. [8] з деякими модифікаціями [9]. Мінеральну основу доповнювали вітамінами, регуляторами росту, іншими органічними добавками, зокрема сахарозою (від 2 до 5%), у багатьох випадках — мезоінозитом (20–100 мг/л), гідролізатом казеїну (50–1 000 мг/л), інколи — дріжджовим екстрактом (100–500 мг/л). У середовища вносили від 0,1 до 2 мг/л ауксинів — 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти (2,4-Д), 1-нафтилоцтової кислоти (НОК) або індолілоцтової кислоти (ІОК) у різних комбінаціях із 0,02–1 мг/л 6-фурфуріламінопурину (кінетину). У деяких варіантах використовували цитокінін БАП (6-бензил-

амінопурин) і гіберелову кислоту ГК₃. Застосовували також середовища, які містили лише мінеральну основу та сахарозу (середовище 5С за Воллосовичем та ін. [8]). Деякі приклади складу найуживаніших середовищ наведено в табл. 1.

Усі середовища, окрім середовища 5С, що містить тільки 1 мг/л тіаміну (вітаміну В₁), мали у своєму складі вітаміни (мг/л): В₁ (0,1–1), В₆ (0,5), РР (0,5), а також (окрім середовища В5 і 5С) — гліцин (2 мг/л). Середовище 5С0 додатково містить 0,1 мг/л БАП (бензиламінопурину) і 500 мг/л дріжджового екстракту. До складу середовищ додатково вносили агар (8 000–9 000 мг/л), рН–6,0.

Первинні експланти вирощували як у темряві, так і за штучного освітлення (1 500–2 500 лк, 16 год на добу) при 24–26 °С та відносній вологості повітря 70–80% у пробірках діаметром 2 см з робочим об'ємом 10 мл. Пасивовані калюсні тканини, а також отримані регенеранти вирощували як у пробірках, так і в конічних колбах об'ємом 250 мл з робочим об'ємом 50 мл за тих самих фізичних умов.

Таблиця 1. Склад основних типів живильних середовищ, використаних у досліді з мікроклонального розмноження *U. victoris*, мг/л

Індекс середовища	Регулятори росту*				Органічні добавки		
	2,4-Д	НОК	ІОК	кінетин	мезоінозит	гідролізат казеїну	сахароза
Середовища з мінеральною основою Мурасіге-Скуга за [6]							
МС	–	–	2	0,2	100	–	30 000
МС-1	1	–	–	0,1	100	1000	30 000
МСТ	–	2	–	1	80	500	30 000
Середовища з мінеральною основою Ерікссона за [7]							
Ер	–	1	–	0,02	–	–	40 000
Середовища з мінеральною основою Гамборга за [5]							
В5	2	–	–	–	100	–	20 000
Середовища з мінеральною основою Воллосовича та ін. за [8]							
5С	–	–	–	–	–	–	50 000
5С0	0,5	–	1	0,1	100	500	50 000
5С01	–	2	–	1	80	500	50 000
5С02	–	0,5	–	0,1	50	200	50 000
5С03	–	0,1	–	0,02	20	50	50 000
5С1	1	–	–	0,1	80	500	50 000
5С2	0,5	–	–	0,1	50	200	50 000
5С3	0,1	–	–	0,02	20	50	50 000
5С3Н	–	0,5	–	0,02	20	50	50 000
5С3І	–	–	2	0,02	20	50	50 000

* 2,4-Д — 2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота; НОК — 1-нафтилоцтова кислота; ІОК — індолілоцтова кислота; кінетин — 6-фурфуріламінопурин

Візуально визначали частоту регенерації, кількість регенерантів на експлант, частоту калюсоутворення, тип росту (морфологію калюсу). Отримані результати обробляли методами статистичного аналізу [10].

Результати та обговорення

У наших досліджах утворення регенерантів на фрагментах ізольованих лусок цибулин унгернії Віктора, частота й інтенсивність калюсоутворення, а також регенерація мікроцибулинок пасивованими калюсними культурами під час вирощування в умовах освітлення були набагато гіршими порівняно з аналогічними умовами вирощування у темряві. У багатьох випадках на світлі такі процеси повністю інгібувалися. Наведені далі результати експериментів отримано у процесі вирощування без освітлення, окрім дослідів, де спеціально зазначено умови вирощування одержаних регенерантів на світлі.

Із досліджених понад 50 варіантів агаризованих живильних середовищ проліферацію та/або регенерацію вдалося індукувати в експлантів від усіх 10 вивчених цибулин на 15 варіантах середовищ, поданих у табл. 1. При цьому слід зазначити, що в різних цибулин реакція на одні й ті самі умови культивування експлантів була різною: експланти від однієї цибулини утворювали переважно калюс, від іншої — інтенсивніше формували мікроцибулинки, від третьої — поряд з калюсоутворенням і прямою регенерацією виникали коренеподібні структури, інколи — тератомоподібні утворення тощо (рис. 1). Це, очевидно, зумовлено відмінностями геномів використаних цибулин, встановлених нами методом RAPD ПЛР-аналізу [11]. Наведені далі результати є узагальненими для експлантів, отриманих від усіх 10 вихідних цибулин.

Пряма регенерація, мультиплікація та вирощування регенерантів *in vitro*. Пряму регенерацію мікроцибулинок вдалося індукувати на 14 варіантах середовищ (табл. 2). На середовищі Гамборга В5 експланти не формували регенеранти, низьким був ефект і в разі використання живильних середовищ з мінеральною основою за Мурасіге–Скугом і Ерікссоном. З частотою 15% і більше регенеранти утворювались лише на варіантах середовищ з мінеральною основою 5С за Воллосовичем та ін. [8], які містили із ауксинів НОК (0,5–2 мг/л) або ІОК (1–2 мг/л) та цитокінін кінетин (0,02–1 мг/л). Найкращими для індукції прямої регенерації були середовища 5СЗІ та 5СЗН з незначною кіль-

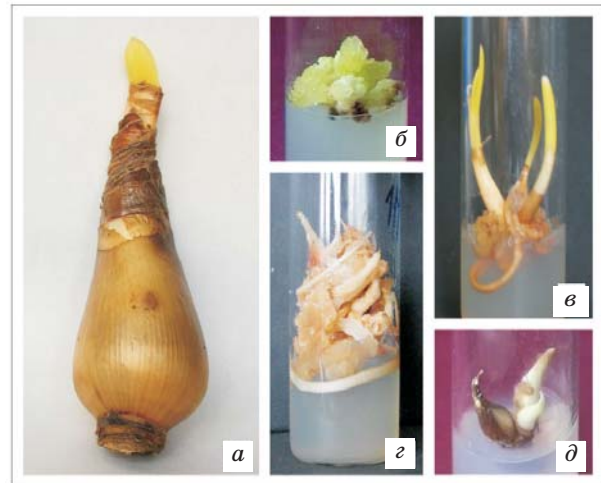


Рис. 1. Мікроклональне розмноження *U. victoris*:

a — загальний вигляд однієї із вихідних цибулин масою 120 г і віком близько 45 років, що виростає у природних умовах (південні схили Гіссарського хребта, Памір, Таджикистан);
б — первинний калюс на 60-ту добу після ізоляції фрагмента луски цибулини;
в — регенерація мікроцибулинок, яка відбувається на первинному експланті поряд з калюсоутворенням;
г — органогенна пасивована культура тканин, що спонтанно формує коренеподібні та тератомоподібні структури;
д — мікророзмноження регенерантів: пересаджена мікроцибулина (темного кольору) на середовищі 5СЗІ формує нові мікроцибулинки (світлого кольору).

кістю кінетину (0,02 мг/л) та ІОК (2 мг/л) або НОК (0,5 мг/л) (табл. 1, 2). На цих середовищах на кожному експланті, здатному до регенерації, формувалось у середньому 3–4 мікроцибулинки (табл. 1, 2; рис. 1).

Пошук умов подальшого розмноження (мультиплікації) цибулинок-регенерантів проводили на тих варіантах середовищ, які з найвищою частотою та інтенсивністю індукували пряму регенерацію. Серед них найефективнішим виявилось середовище 5СЗІ (табл. 1). Кожна окрема рослинка-регенерант на цьому середовищі через 30–40 діб утворювала 3–6 і більше нових мікроцибулин. За необхідності подальшого розмноження утворений пучок цибулин поділяли на окремі цибулинки і знову переносили на те саме середовище. Здатність регенерованих цибулинок до мікророзмноження на середовищі 5СЗІ зберігалась протягом усього дослідження, тобто щонайменше 6 років.

Для прискореного розвитку окремих цибулинок найефективнішим виявилось середовище 5СЗН. На цьому середовищі в термостатованих умовах (22–26 °С) з 14–16-годинним світловим днем і з освітленням

Таблиця 2. Результати мікроклонального розмноження *U. victoris* шляхом прямої регенерації фрагментів лусок цибулин. Сумарні дані дослідів, отримані у різні роки з десятима різними цибулинами

Індекс середовища*	Вивчені експланти, шт. **	Експланти, що регенерують мікроцибулини, %	Середня кількість мікроцибулин на експлант, що регенерує, шт.
МС	343	2,6±0,9	1,1
МС-1	613	3,1±0,7	1,2
МСТ	324	3,7±1,0	1,2
Ер	278	2,9±1,0	1,3
В5	142	0	0
5С	193	1,0±0,7	1,0
5С0	345	9,6±1,6	1,1
5С01	893	29,0±1,5	1,9
5С02	295	15,3±2,1	1,4
5С03	410	5,1±1,1	1,1
5С1	829	2,5±0,5	1,1
5С2	211	1,4±0,8	1,0
5С3	178	1,1±0,8	1,0
5С3Н	421	34,4±2,3	3,1
5С3І	450	59,1±2,3	4,1

* Склад живильного середовища наведено у табл. 1.

** У кожному варіанті досліді використано матеріал не менше ніж від трьох цибулин.

1 500–2 500 лк через 20–40 діб цибулинка формували корені та листочки і росли, а через 50–60 діб переходили до стану спокою, при цьому листочок засихав. Із перенесенням сплячої цибулинка на свіже середовище того самого складу вона знову формувала 1–3 листочки (залежно від віку цибулинка), і весь цикл повторювався. У результаті таких процесів мікроцибулини за 1,5–2,5 роки вирощування *in vitro* досягали стадії розвитку, яка відповідає віку 5–7-річних цибулинок, отриманих із насіння у разі росту їх у природних умовах.

Використання живильних середовищ іншого складу, зокрема з мінеральною основою Мурасіге–Скуга, Лінсмайер–Скуга, Гамборга В5, Еріксона, Уайта, з різною кількістю та співвідношенням органічних добавок було малоефективним: індукування регенерації мікроцибулинок спостерігали рідко (менше ніж у 1–2% експлантів), а одержані регенеранти були здатні до ефективної мультиплікації лише на середовищі 5С3І, а до подальшого росту і розвитку — на середовищі 5С3Н.

Отримання культури тканин та індукція регенерації (редиференціювання). На 15 варіантах середовищ спостерігали калюсо-

утворення з частотою від 1% до близько 80% (табл. 3). З частотою 30% і більше калюс утворювався лише на варіантах середовищ з мінеральною основою за Воллосовичем та ін. [8] та МС за Мурасіге–Скугом [6], які містили 0,5–2 мг/л 2,4-Д і 0,1 мг/л кінетину. Досить часто первинний калюс формувався і на середовищах того самого складу з 2 мг/л НОК або 1–2 мг/л ІОК і 0,2–1 мг/л кінетину. На середовищах без 2,4-Д калюс утворювався пізніше (візуально на 60–70-ту добу росту замість 40–50-ї доби), характеризувався повільним ростом, але був органогенним і поряд з калюсом на первинних експлантах формувались окремі регенеранти-мікроцибулинки, корені, а згодом — і ризогенні структури тератомного виду (табл. 2, 3, рис. 1, 2).

У процесі пасивування та подальшого вирощування отриманих калюсних тканин на тих самих живильних середовищах, на яких їх було одержано, більшість варіантів калюсів через 5–10 пасажів темніли й гинули. Продовжували активно рости лише калюсні тканини, які були отримані та вирощувались на середовищах 5С1 і 5С01. На інших варіантах середовищ, де також спостерігали інтенсивне калюсоутворення з ви-

Таблиця 3. Частота калюсоутворення та типи первинного калюсу *U. victoris* на різних живильних середовищах.
Сумарні дані дослідів, отримані у різні роки з десятима різними цибулинами

Індекс середовища*	Вивчені експланти, шт. **	Експланти, що утворюють калюс, %, $M \pm m$	Тип калюсу, %	
			Органогенний***	Неорганізований
5С	193	1,0±0,7	100	0
5С02	295	9,8±1,7	93,1	6,9
5С3І	450	10,0±1,4	100	0
Ер	278	12,9±2,0	83,3	16,7
5С3	178	19,1±2,9	52,9	47,1
5С3Н	421	24,5±2,1	98,1	1,9
В5	142	26,8±3,7	23,7	76,3
МС	343	31,2±2,5	82,2	17,8
МСТ	324	34,3±2,6	67,6	32,4
5С2	211	45,5±3,4	46,9	53,1
5С0	345	44,1±2,7	52,6	47,4
5С01	893	56,3±1,7	69,4	30,6
МС-1	613	78,8±1,7	36,0	64,0
5С1	829	79,7±1,4	22,4	77,6
5С03	410	12,4±1,6	52,9	47,1

* Склад середовищ див. табл. 1.

** У кожному варіанті досліді використано матеріал не менше ніж від трьох цибулин.

*** Органогенний калюс — калюс зі сформованими цибулинками, стеблами, коренями та їхніми зачатками.

Примітка. На одному калюсі можна спостерігати різні структури, включаючи тератомоподібні. Аналіз проведено на 70–80-ту добу культивування експлантів.

сокою частотою (табл. 3), зокрема на варіантах середовищ з мінеральною основою за Гамборгом В5 та Мурасіге–Скугом (МС), тривало пасивованих тканин отримати не вдалося.

Одержані пасивовані калюсні лінії, що інтенсивно росли на зазначених вище середовищах (лінія 5С1 та лінія 5С01), відрізнялися за морфологією. Лінія 5С1 характеризувалась стабільним неорганізованим ростом, а лінія 5С01 — нижчим темпом росту і була морфогенною (генетичні, цитологічні та фізіологічні особливості цих та інших клітинних ліній унгернії Віктора наведено у роботах [12, 13]). Ці відмінності, очевидно, зумовлені різним гормональним складом живильних середовищ: лінія 5С1 була отримана й вирощувалась на середовищі з 1 мг/л 2,4-Д та 0,1 мг/л кінетину, а лінія 5С01 — на середовищі з 2 мг/л НОК і 1 мг/л кінетину. За іншими складовими ці середовища не відрізнялись (табл. 1).

Морфогенна клітинна лінія 5С01 після перенесення її на середовище 5С3Н інтенсивно формувала мікроцибулинки. Це явище спостерігали протягом 3–4 років.

Лінія 5С1 характеризувалась неорганізованим типом росту. У разі перенесення її після 2–7 пасажів на середовище 5С01 також спостерігали неорганізований ріст, однак на середовищі 5С3Н вона упродовж 6 років виявляла здатність до регенерації мікроцибулинки.

У результаті викладених і низки інших дослідів, дані яких тут не наведено, було встановлено й у подальших дослідях підтверджено, що оптимальним середовищем для індукції калюсоутворення і подальшого вирощування калюсних тканин унгернії Віктора є середовище 5С1. Калюс, отриманий на цьому середовищі, після перенесення через 2–7 пасажів на середовище 5С3Н і під час подальшого вирощування на ньому постійно регенерує мікроцибулинки. Той самий калюс після перенесення на середовище 5С01 може тривалий час вирощуватись на цьому середовищі у вигляді морфологічно гомогенної тканини як на твердому (агаризованому) середовищі, так і в рідкому середовищі на шейкерах. Цей калюс у разі перенесення на середовище 5С3Н здатен регенерувати рослини протягом не менше 6 років. Описану

ЛІТЕРАТУРА

1. *Машковский М. Д.* Лекарственные средства: Пособие по фармакотерапии для врачей. — В 2-х томах. — М.: Медицина, 1985. — 1 000 с.
2. *Ходжиматов М.* Дикорастущие лекарственные растения Таджикистана. — Душанбе: Гл. научн. ред. Тадж. Сов. Энциклопедии, 1989. — 368 с.
3. *Черкасов О. А., Майсурадзе Н. И., Глызина Г. С., Гаевский А. В.* Содержание галантамина в некоторых сортах *Narcissus hybridus* Hort. // Раст. ресурсы. — 1993, Вып. 4. — С. 81–87.
4. *Кунах В. А.* Биотехнология лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. — К.: Логос, 2005. — 730 с.
5. *Кушнір Г. П., Сарнацька В. В.* Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика // К.: Наук. думка, 2005. — 270 с.
6. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. plant.* — 1962. — V. 15, N13. — P. 473–497.
7. *Eriksson T.* Studies on the growth requirements and growth measurements of cell cultures of *Haemaphysalis gracilis* // *Ibid.* — 1965. — V. 18. — P. 976–993.
8. *Волосович А. Г., Пучинина Т. Н., Николаева Л. А.* Оптимизация состава макроселей для культуры тканей *Rauwolfia serpentina* Vent. // Раст. ресурсы. — 1979. — Т. 15, №4. — С. 516–526.
9. *Пат. 10338UA, 5МПК C12№5/00, C12№5/02.* Живильне середовище для одержання і вирощування калюсних тканин рослин / В. А. Кунах, Л. К. Алпатова, Л. П. Можилевська — Заявл. 19.03.1993; Опубл. 25.12.1996, Бюл. №4.
10. *Рокицкий П. Ф.* Введение в статистическую генетику. — Минск: Вышэйшая школа, 1974. — 448 с.
11. *Бублик О. М., Андреев И. О., Спиридонова К. В., Музыка В. И. та ін.* Генетична гетерогенність рідкісного ендемічного виду *Ungernia victoris* (*Amaryllidaceae*): RAPD-аналіз // Укр. ботан. журн. — 2008. — Т. 65, № 3. — С. 445–452.
12. *Кунах В. А., Можилевская Л. П., Потапчук Е. А., Музыка В. И. и др.* Получение культуры тканей *Ungernia victoris* и ее особенности при выращивании на питательных средах различного состава // Биотехнология. — 2007. — № 1. — С. 14–21.
13. *Бублик О. М., Андреев И. О., Спиридонова К. В., Кунах В. А.* Мінливість морфогенної та неморфогенної культури тканин *Ungernia victoris* за результатами RAPD-ПЛР // Вісник Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. — 2008. — Т. 6, № 1. — С. 44–51.

**МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ
УНГЕРНИЙ ВИКТОРА (UNGERNIA VICTORIS
VVED. EX ARTJUSCHENKO)**

V. A. Kunakh¹
L. P. Mozhylevska¹
O. M. Bublyk¹
I. V. Kolonina²
V. I. Muzyka²

¹ Інститут молекулярної біології і генетики
НАН України, Київ
² ООО «Унгернія», Москва, Росія

Для редкого лікарського рослини *Ungernia victoris* вперше розроблені умови мікроклонального розмноження як прямої регенерації з фрагментів чешуек луковичи, так і індукцією регенерації з калюсних тканин, довготривало вирощуваних *in vitro*. Підібрані також умови мультиплікації і вирощування *in vitro* отриманих мікролуковиц-регенерантів.

Ключевые слова: *Ungernia victoris*, мікроклональне розмноження, пряма регенерація рослин, індукція регенерації рослин.

**MICROCLONAL PROPAGATION
OF UNGERNIA VICTORIS VVED. EX
ARTJUSCHENKO**

V. A. Kunakh¹
L. P. Mozhylevska¹
O. M. Bublyk¹
I. V. Kolonina²
V. I. Muzyka²

¹ Institute of Molecular Biology and Genetics
of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
² LTD «Ungernia», Moscow, Russia

Approaches to microclonal propagation of the rare medicinal plant *Ungernia victoris* both through the direct regeneration from the scale of bulb and via induction of regeneration from the long-term grown *in vitro* callus tissues have been developed for the first time ever. Conditions for multiplication and maintenance of *in vitro* generated microbulb-regenerants were specified as well.

Key words: *Ungernia victoris*, microclonal propagation, direct plant regeneration, induction of plant regeneration.

МОДИФИКАЦИЯ ПШЕНИЧНОГО КРАХМАЛА РАЗЛИЧНЫМИ АМИЛАЗАМИ

Л. В. Капрельянци
Т. В. Шпырко
Е. Ф. Помазанова

Одесская национальная академия пищевых технологий

E-mail: Kaprelyants@paco.net

Исследовано влияние различных препаратов α -амилазы на пшеничный крахмал и его фракции. В образцах определяли олигосахариды с различной молекулярной массой. Показано, что гидролизаты с низким глюкозным эквивалентом обладают термореверсивными свойствами при определенном соотношении низко- и высокомолекулярных фракций крахмала.

Ключевые слова: крахмал, амилазы, гидролизат, ферментативный гидролиз, мальтоолигосахариды.

Для улучшения качества пищевых продуктов, придания им желаемой консистенции, снижения калорийности применяют различные пищевые добавки: загустители, студнеобразователи, желирующие вещества, эмульгаторы и стабилизаторы [1].

Понижение калорийности достигается уменьшением содержания жиров и сахара в продуктах. Вместо них используют масло и жирозаменители, получаемые из крахмала путем его модификации с целью улучшения растворимости, усваиваемости, совместимости с другими пищевыми компонентами [2, 3].

Один из способов получения модифицированного крахмала — его ферментативная обработка различными амилазами. Специфическая деградация полисахаридных фракций крахмала способствует получению продуктов с различной степенью расщепления, измеряемой глюкозным эквивалентом (ГЭ).

Выбор ферментов определяется желаемым углеводным составом конечного продукта. Фермент α -амилаза дает в основном мальтодекстрины, а глюкоамилаза — большое количество глюкозы, гидролизуя последовательно α -(1,4)-связи. В результате гидролиза ферментом β -амилазой образуется значительное количество мальтозы. Используя комбинации ферментов, можно получать продукты гидролиза с различным ГЭ. Гидролизаты крахмала с низким ГЭ находят широкое применение в пищевой промышленности [4, 5].

Традиционно для получения различных продуктов биоконверсии крахмала в качест-

ве субстрата используют кукурузный крахмал [6]. Однако, учитывая масштабы производства пшеницы в Украине, значительный интерес вызывает использование пшеничного крахмала как альтернативного сырьевого источника. В процессе переработки пшеницы из нее получают клейковину, используемую при производстве диетических сортов хлеба и для улучшения хлебопекарных свойств муки низкого качества [7–10]. Крахмальная фракция может служить субстратом для ферментативной модификации.

Настоящая работа посвящена изучению действия различных амилаз на пшеничный крахмал в зависимости от размера крахмальных гранул.

Материалы и методы

В работе использовали пшеничный крахмал, выделенный из муки пшеницы сорта Одесская 51 урожая 2005 г. по методу [12].

Результаты анализа крахмала показали, что он отвечает требованиям стандарта [13].

Полученный крахмал фракционировали по размеру крахмальных зерен путем седиментации и центрифугирования. Для характеристики фракций диаметр зерен измеряли под микроскопом: фракция I — 20–25 мкм; фракция II — 2–5 мкм. Фракционирование на амилозу и амилопектин проводили по методу [12].

В работе применяли ферментные препараты: амилосубтилин П10х (3500 ед. АС/г препарата), амилоризин П10х (1600 ед.

АС/г), пуллуназу из *Klebsiella aerogenes*, выпускаемые Ладжинским заводом ферментных препаратов, и Fungamyl 800 фирмы Novo (4500 ед. АС/г).

Ферментные препараты отличаются степенью активности, способом получения (глубинное, поверхностное), видом микроорганизма-продуцента и условиями оптимальной активности.

Ферментативную обработку пшеничного крахмала (15 мг/мл) выполняли при рН 6 (0,1 М ацетатный буфер) и температуре 40–50 °С.

Через определенные промежутки отбирали пробы гидролизата. Ферментативную обработку проводили в реакторе при постоянном перемешивании (250 мин⁻¹).

Углеводный состав гидролизатов определяли на жидкостном хроматографе (колонка С₁₆, 4,6×250 мм), фаза DEAE-SI 100; 0,005 мм; носитель — ацетонитрил – вода (80:20); скорость — 1 мл/мин; температура 20 °С; время — 20–30 мин; детектор — рефрактометр; ГЭ определяли методом Шамодьи–Нельсона [13].

Гель-хроматографирование низко- и высокомолекулярных фракций продуктов ферментативной обработки проводили на колонке сефадекса G-100 (100×1,5 см). Полисахарид массой 10–15 мг, растворенный в воде либо гидроксиде натрия в концентрации 0,5 моль/л, вносили в колонку, уравновешенную соответствующим растворителем. Объем собираемых фракций 3 мл, скорость истечения 10 мл/час. Выход фракций контролировали по антрону и фенолсерным методом.

Калибровку колонки осуществляли с помощью стандартного набора декстранов в диапазоне молекулярных масс от 10⁴ до 10⁶.

Результаты и обсуждение

Влияние различных концентраций ферментных препаратов на гидролиз пшеничного крахмала представлено на рис. 1.

Концентрацию ферментных препаратов выбирали из расчета на 1 г крахмала — 1 ед. активности ферментного препарата.

Феномен различной активности амилолитических ферментов по отношению к крахмальным полисахаридам также обусловлен тем, что ряд полисахаридаз обладает сорбционными доменами [10].

Исходя из результатов наших исследований можно предположить, что большая способность разрушать нерастворимый субстрат пшеничного крахмала препаратами

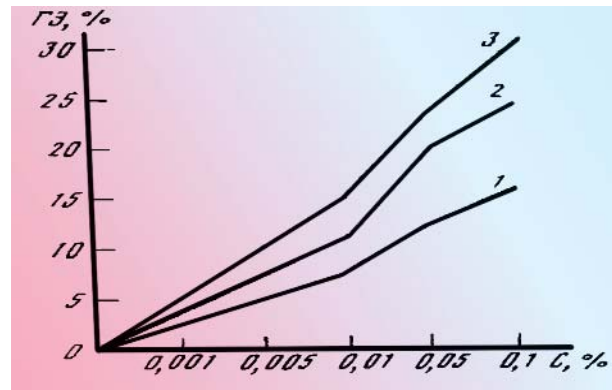


Рис. 1. Влияние концентрации ферментных препаратов (С) на накопление редуцирующих веществ за 30 мин реакции:

- 1 — амилоризин П10х;
- 2 — амилосубтилин Г10х;
- 3 — фунгамил 800

фунгамил 800 и амилосубтилин Г10х обусловлена присутствием сорбционных доменов, обеспечивающих избирательное связывание фермента.

В табл. 1 приведены экспериментальные данные, характеризующие ферментативный гидролиз двух фракций пшеничного крахмала, проведенный с помощью различных препаратов, отличающихся размерами крахмальных гранул: фракция I — 20–25 мкм, фракция II — 2–5 мкм.

Таблица 1. Влияние ферментных препаратов на накопление редуцирующих веществ в зависимости от размера крахмальных гранул, %

Время гидролиза, мин	Амилосубтилин Г10х		Амилоризин П10х		Фунгамил 800	
	Номер фракции					
	I	II	I	II	I	II
5	4,9	3,7	2,3	2,0	10,1	8,8
10	13,4	12,1	5,7	4,9	16,3	14,3
15	17,7	16,6	10,1	10,0	19,4	17,3
30	21,5	19,8	15,8	16,1	24,3	20,8
60	26,5	25,4	19,2	18,0	27,8	26,5
90	29,4	28,7	20,6	19,2	32,4	30,3

Примечание. Фракция I — размер крахмальных гранул 20–25 мкм; фракция II — размер крахмальных гранул 2–5 мкм.

В выбранных условиях ферментные препараты амилосубтилин Г10х и фунгамил 800 быстрее расщепляют крупные крахмальные зерна, чем мелкие. Препарат амилоризин П10х практически с одинаковой скоростью расщепляет как крупные, так и мелкие зерна крахмала.

Различное действие ферментов на крахмальные зерна разных размеров, очевидно, связано с неодинаковой способностью образовывать ферментсубстратные комплексы, а также с различным содержанием в субстрате связей α -1,4- и α -1,6-, обусловленным разным количеством амилозы и амилопектина в крахмале.

Как показали исследования, в крупных зернах пшеничного крахмала (фракция I) содержится $29,1 \pm 0,4\%$ амилозы, а в мелких зернах (фракция II) — $23,9 \pm 0,5\%$. Следовательно, фракция II обладает меньшей чувствительностью к ферментализу, поскольку содержит большее количество α -1,6-связей, недоступным для действия молекул α -амилаз.

В литературе имеются противоречивые сведения об углеводном составе ферментных гидролизатов различных фракций пшеничного и других зерновых крахмалов. Так, в работе [15] указывается на разный олигосахаридный состав продуктов амилолиза мелких и крупных гранул. В то же время авторы работы [16] при ферментативном гидролизе α -амилазой суспензий двух фракций пшеничного крахмала показали идентичность продуктов гидролиза.

Сравнение олигосахаридного состава ферментализатов мелких и крупных фракций пшеничного крахмала под действием различных препаратов α -амилаз позволило получить представление о различии продуктов реакции в результате деструкции крахмальных молекул (табл. 2).

Таблица 2. Углеводный состав различных фракций пшеничного крахмала, %

Углеводы	Амилосуб- тилин Г10х		Амилори- зин П10х		Фунгамил 800	
	Номер фракции					
	I	II	I	II	I	II
Глюкоза	5,2	5,4	3,3	2,9	7,7	7,9
Мальтоза	10,0	9,7	12,4	12,0	14,1	13,8
Мальто- триоза	11,3	11,0	14,5	13,9	14,0	12,6
Мальто- пентоза	17,3	17,3	12,8	13,0	21,3	20,3
Мальто- гексоза	12,4	10,1	9,8	8,8	7,1	6,7
Мальто- гептоза	7,5	6,9	9,7	9,7	4,1	3,8
Высокомо- лекулярные декстрины	32,6	34,0	33,7	36,1	25,1	29,1

Примечание. Фракция I — размер крахмальных гранул 20–25 мкм; фракция II — размер крахмальных гранул 2–5 мкм.

Из приведенных в табл. 2 данных видно, что по углеводному составу фракции пшеничного крахмала, подвергнутые гидролизу различными препаратами α -амилаз, не различаются.

Количество олигосахаридов в продуктах гидролиза зависит от специфичности ферментного препарата. Так, если в гидролизате крахмала, подвергнутого обработке амилосубтилином Г10х, низкомолекулярных олигомеров содержится 63,7 % (фракция I) и 60,4 % (фракция II), то в продуктах гидролиза фунгамилем 800 — 68,3 % и 65,1 % соответственно.

Высокомолекулярные составляющие продуктов амилолитической деструкции пшеничного крахмала были разделены с помощью гель-хроматографии на сефадексе G-100 (рис. 2).

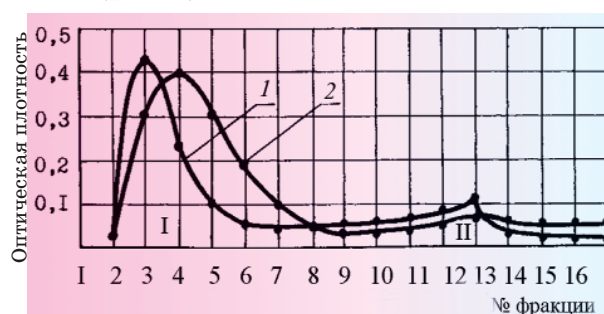


Рис. 2. Выходная кривая гель-хроматографирования пшеничного крахмала на сефадексе G-100:

1 — исходный;
2 — обработанный амилосубтилином Г10х

Средневесовая степень полимеризации (СП) высокомолекулярной фракции в результате деструкции полисахаридов крахмала составила 70–500. Высокомолекулярная часть продуктов гидролиза имеет бимодальное распределение средневесовой СП, где выделяются фракции с СП 60–240 и 200–500.

С применением ферментативного гидролиза высокомолекулярной фракции продуктов гидролиза крахмала препаратом пуллуназы установлено, что в ее составе представлены разветвленные молекулы с преобладанием α -1,6-связей, что свидетельствует о происхождении этой фракции из амилопектина. На рис. 3 показана сравнительная гидролизуемость высокомолекулярных фракций крахмала амилосубтилином Г10х и амилосубтилином Г10х + пуллуназой.

При изучении свойств продуктов деструкции полисахаридов пшеничного крахмала α -амилазами было отмечено, что гидролизаты с низким глюкозным эквивалентом (ГЭ — 5–12%) и определенным распределе-

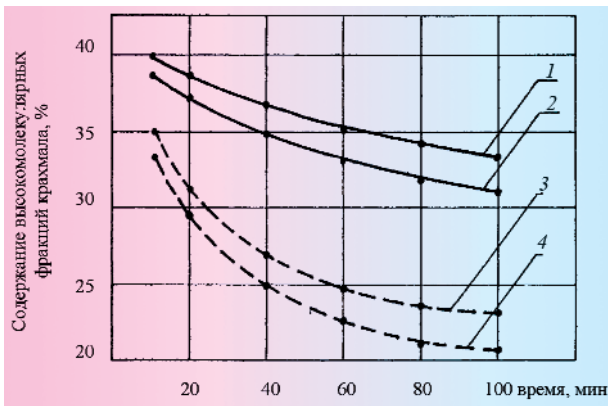


Рис. 3. Сравнительная гидролизуеть пшеничного крахмала:

1, 2 — амилосубтили Г10х (фракции 1, 2);
3, 4 — амилосубтили Г10х + пуллуназа (фракции 1, 2)

нием молекул низко- и высокомолекулярных фракций обладают способностью к образованию термически обратимых гелей аналогично продуктам ферментативной обработки α -амилазами картофельного крахмала [17,18].

Термореверсивные свойства гидролизатов обнаруживаются при определенной комбинации двух фракций в продуктах амилолиза. Структурная сеть геля, очевидно, образуется за счет межмолекулярного взаимодействия высокомолекулярных компонентов разветвленных фракций крахмала из

остатков молекул амилопектина, а низкомолекулярные декстрины выполняют межмолекулярную стабилизирующую роль [19].

Разное соотношение фракций в продуктах гидролиза пшеничного крахмала α -амилазами приводит к образованию гелей, отличающихся прочностью, консистенция гелей зависит также от содержания сухих веществ в гидролизатах.

Полученные гидролизаты из пшеничного крахмала с низким ГЭ (5–12%) легко смешиваются с жирами без изменения их структуры, поэтому могут быть использованы в качестве заменителей в продуктах с пониженной калорийностью.

Таким образом, регулируя условия ферментативной модификации пшеничного крахмала α -амилазами, можно получить гидролизаты с различным углеводным составом. Степень деструкции полисахаридов пшеничного крахмала зависит от структуры крахмальных зерен и показателей используемого ферментного препарата. Продукты амилолитической деструкции пшеничного крахмала, обладающие термореверсивными свойствами, могут быть использованы в продуктах питания, а исходный крахмал – в качестве сырья для биотехнологической переработки.

ЛИТЕРАТУРА

- Капрельяниц Л. В. Функціональні продукти. — Одеса: Друк, 2003. — 333 с.
- Капрельяниц Л. В. Ферменты семейства α -амилаз и их применение в биоконверсии крахмала // *Зерновые продукты и комбикорма*. — 2006. — №1. — С. 34–36.
- Капрельяниц Л. В. Ферменты в пищевых технологиях: вчера, сегодня, завтра // *Пищевые ингредиенты и добавки*. — 2006. — №2. — С. 48–51.
- Капрельяниц Л. В. Біотехнологія у виробництві харчових продуктів // *Харчова і переробна промисловість*. — 1992. — №8. — С. 121.
- Grabb W. D., Mitchinson C. Enzymes involved in the processing of starch to sugars // *Trends Biotechnol.* — 1997. — V. 15. — P. 349–352.
- Grabb W. D., Shetty J. K. Commodity sale production of sugars from starches // *Curr. Opin. Microbiol.* — 1999. — V. 2. — P. 252–256.
- Капрельяниц Л. В., Шпырко Т. В. Гидролиз крахмалов пшеничной муки амилазами // *Материалы I Междунар. конференции «Крахмал и крахмалсодержащие источники — структура, свойства и новые технологии»*. — М., 2001. — С. 119–120.
- Капрельяниц Л. В., Шпырко Т. В. Биотехнологические приемы при получении клейковины из низкокачественной пшеницы // *Зерновые продукты и комбикорма*. — 2002. — №4. — С. 23–26.
- Капрельяниц Л. В., Иоргачева Е. Г., Шпырко Т. В. Ферментативная модификация зерновых крахмалов // *Хранение и переработка зерна*. — 2002. — №10. — С. 53–55.
- Шпырко Т. В. Розробка біотехнології переробки зернової сировини в харчові добавки: Дис. ... канд. техн. наук: 03.00.20. — Одеса, 2003. — 183 с.
- Лукин Н. Д., Ладур Т. А. Применение термостабильной альфа-амилазы — амилолихетерм Г18х в производстве сахаристых крахмалопродуктов // *Хранение и переработка сельхозсырья*. — 1999. — №4. — С. 39.
- Рихтер М., Аугустат З., Ширбаум Ф. Избранные методы исследования крахмала. — М.: Пищевая промышленность, 1975. — С. 183.
- Методы биохимических исследований растений / Под ред. А.И. Ермакова. — Л.: Агропромиздат, 1987. — С. 4.

14. Рабинович М. Л. Полисахаридазы: новый материал для белкового дизайна: Новости науки и техники. Сер. Биотехнология. — М., 1990. — Вып. 4. — С. 22.
15. Alkins D. P., Kennedy J. F. Starch granules of developing wheat kernels // *Starke*. — 1985. — V. 37, N12. — P. 421–427.
16. MacGregor A. W. In *New Approaches to Research Cereal Carbohydrates*. — Florida CRC Press, 1985. — P. 149–160.
17. Bradshaw I. J., Lidsay M., Kennedy J. F. Molecular structure of starch// *Food Sci. Technol. Today*. — 1987. — V. 1, N1. — P. 24–27.
18. Bulpin P. V., Cutler A. N., Dea I. C. M. Starch and its components// *Gums and Stabilisers for the Food Industry*. — Oxford, 1984. — P. 541–550.
19. Van der Maarel M., Euverink G. J., Binne-
ma D. J. Amylomaltase from hyperther-
mophilic bacterium *Thermus thermophilus*:
enzyme characteristics and applications in
the starch industry // *Med. Fac. Landbouwniv
Gent*. — 2000. — V.65. — P. 231–234.

МОДИФІКАЦІЯ ПШЕНИЧНОГО КРОХМАЛЮ РІЗНИМИ АМІЛАЗАМИ

*Л. В. Капрельяни
Т. В. Шпирко
О. Ф. Помазанова*

Одеська національна академія
харчових технологій

E-mail: Kaprelyants@paco.net

Досліджено вплив різних препаратів α -амілази на пшеничний крохмаль та його фракції. У зразках визначали олігосахариди з різною молекулярною масою. Показано, що гідролізати з низьким глюкозним еквівалентом мають термореверсивні властивості за певного співвідношення низько- і високомолекулярних фракцій крохмалю.

Ключові слова: крохмаль, амілази, гідролізат, ферментативний гідроліз, мальтоолігосахариди.

MODIFICATION OF WHEAT STARCH BY DIFFERENT AMYLASES

*L. V. Kaprelyants
T. V. Shpirko
O. F. Pomazanova*

Odessa National Academy
of Food Technologies

E-mail: kaprelyants@paco.net

Effect of different preparations of α -amylase on the wheat starch and its fractions has been studied. Oligosaccharides with different molecular mass have been detected in the samples. It has been shown that hydrolysates with low glucose equivalent have the thermally reversible properties under the determined interrelation between low- and high-polymeric fractions of the starch.

Key words: starch, amylases, hydrolysate, enzymatic hydrolysis, oligosaccharides.

УДК 541.13:577.112.087

БІОЛЮМІНЕСЦЕНТНІ БАКТЕРІЇ ЯК СЕНСОРНІ ЕЛЕМЕНТИ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ІОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

А. М. Задорожня

Т. Г. Грузіна

С. М. Дибкова

З. Р. Ульберг

Інститут біологічної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України, Київ

E-mail: tgruzina@mail.ru

Виявлено дозозалежний ефект інгібування іонами золота інтенсивності природної люмінесценції штаму *Photobacterium phosphoreum* B7071 (lux^+). Клітини цих бактерій можуть слугувати сенсорним елементом біологічного аналізатора для визначення вмісту іонного золота, наприклад у стічних водах золотодобувних та золотопереробних підприємств, з метою контролю додержання технологічних процесів.

У результаті кон'югативного схрещування отримано клітини транскон'югату *Pseudomonas fragi* T2(5), що містять гібридну плазмиду (Zn^Rlux^+) і здатні високоспецифічно випромінювати світло під час контакту з іонами цинку. Це уможливує використання їх як чутливого елемента в біологічному високоспецифічному визначенні якісного та кількісного вмісту цього металу в об'єктах довкілля.

Ключові слова: бактерії, природна біологічна люмінесценція, індукована біологічна люмінесценція, визначення, золото, цинк, кон'югативне схрещування.

Однією з основних проблем швидкої індустріалізації є значне підвищення вмісту важких металів та їхніх сполук у ґрунтах, природних водоймах і стічних водах промислових підприємств. Залучення цих забруднювачів до трофічної ланки може стати причиною виникнення тяжких захворювань людини [1–3]. Той факт, що важкі метали здатні, навіть у мікроконцентраціях, призводити до локальних порушень цілісності ДНК, робить їх особливо небезпечними [4].

Відомо декілька «рядів небезпеки» іонів важких металів. До одного з найбільш небезпечних для біосфери належать: Au, Ag, Zn, Cd, Cr, Hg, Mn, Pb, Sb, Sn, Te, W [5]. Тож за сучасних умов розвитку промисловості та стану очисних споруд постійний моніторинг об'єктів довкілля, зокрема водного середовища, з метою контролю вмісту цих забруднювачів є вкрай актуальним завданням.

Найпоширенішими методами визначення важких металів є атомна абсорбція, рентгенівська та емісійна спектроскопія [6, 7]. Однак ці методи є високоартістичними, потребують багато часу й, окрім цього, не спроможні визначити саме токсичну частку забруднювача, оскільки відомо, що важкі метали можуть утворювати стійкі комплекси з природними сполуками, які, у свою чергу, не виявляють токсичної дії на біосистеми.

Усіх цих недоліків позбавлені біосенсорні аналітичні системи для визначення вмісту важких металів, у яких сенсорним елементом слугує бактеріальна біологічна люмінесценція. До основних переваг клітинних біосенсорних аналізаторів слід віднести високу чутливість, здатність до визначення біотоксичної частки забруднювача, специфічність, швидкість реакції-відповіді, простоту використання, економічність [8].

Окрім використання як аналітичного сигналу природної здатності бактерій до біологічної люмінесценції, останнім часом набуває стрімкого розвитку напрям зі створення високоспецифічних генетично модифікованих штамів, здатних до індукованої біологічної люмінесценції певними важкими металами [9–12].

З огляду на вищезазначене метою роботи було розроблення сенсорних елементів для визначення іонів важких металів в об'єктах довкілля на основі природних та генетично модифікованих біологічних люмінесцентних штамів бактерій.

Матеріали і методи

Для створення сенсорних елементів було використано бактеріальний штам *Photobacterium phosphoreum* B7071 (lux^+) із колекції морських люмінесцентних бактерій

Кримського медичного інституту ім. С. І. Георгієвського та штаму *Pseudomonas fragi* T2(5) із колекції Інституту біоколоїдної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України.

Вплив іонів важких металів на інтенсивність природної біоломінесценції клітин вивчали на штамі *Photobacterium phosphoreum* B7071 (*lux*⁺). Бактеріальні клітини цього штаму культивували протягом 16–18 год при 22 °С у живильному середовищі такого складу (г/дм³): пептон — 5; дріжджовий екстракт — 5; NaCl — 30; K₂HPO₄·7H₂O — 15; (NH₄)₂HPO₄ — 0,5; MgSO₄ — 0,1; CaCO₃ — 0,2; гліцерол — 3 мл/л.

Концентрацію клітин контролювали спектрофотометрично (спектрофотометр СФ-46, «Ломо», Росія) за довжини хвилі 640 нм.

Для аналізу було використано три метали у різних концентраціях: цинк, кобальт та золото. Цинк та кобальт застосовували у вигляді солей: ZnSO₄·7H₂O та CoCl₂·6H₂O кваліфікації ч.д.а. виробництва Merck (Німеччина), готуючи вихідні 1 М розчини. Золото використовували у формі золотохлористоводневої кислоти (HAuCl₄) (Sigma, США), з вихідною концентрацією 60 мкг/мл за металом.

Клітини бактерій перед аналізом осаджували із середовища росту центрифугуванням (6 000 об/хв, 10 хв) та ресуспендували в середовищі А такого складу: 50 мМ трисамінометанмалат-NaOH буфер, 2,5% NaCl, рН 7 до кінцевої концентрації (*D*₆₄₀ = 0,5), що відповідає 1·10⁶ кл/мл або 0,5 мг/мл сухої маси.

Інтенсивність біоломінесценції бактерій *Ph. phosphoreum* B7071 реєстрували на експериментальному хемілюмінометрі при температурі 23 °С. Хемілюмінометр являє собою комп'ютер, у корпус якого вмонтовано вимірювальну комірку, яка контактує з фотопомножувачем (вимірювальний модуль). Реєстрацію біоломінесценції та обробку отриманих даних проводили за допомогою спеціально розробленої програми. Прилад дозволяє визначати біоломінесценцію в кінетичному режимі з реєстрацією відгуку через кожні 5–10 с. Контролем слугували суспензії клітин, які не містили важких металів.

Для вивчення впливу іонів важких металів на інтенсивність біоломінесценції бактерій *Ph. phosphoreum* B7071 у кюветі хемілюмінометра змішували 0,8 мл суспензії вихідних клітин у середовищі А та відповідні аліквоти металів. Об'єм проби становив 1 мл, час інкубації — 30 хв, час виміру — 10 с. Обраний час інкубації був оп-

тимальним для прояву інгібуючого впливу ксенобіотиків на біоломінесценцію [13].

Для дослідження кінетики інгібування люмінесценції важкими металами 10 мл суспензії клітин у середовищі А, що містять відповідні концентрації металу, інкубували в колбах на магнітній мішалці. При цьому через певні проміжки часу відбирали проби по 1 мл і вимірювали інтенсивність їхньої біоломінесценції.

Штам *Pseudomonas fragi* T2(5) було виділено з дерново-підзолистого ґрунту, забрудненого важкими металами (промисловий район м. Києва), охарактеризовано за культурально-біохімічними ознаками та рівнем стійкості до важких металів з використанням методу посіву на агаризованому трис-мінімальному глюконатвмісному середовищі з концентрацією металів: Zn — 0,8–2 мМ, Co — 1–2 мМ, Ni — 0,8–2 мМ, Cu — 0,8–1 мМ, Cd — 0,8 мМ, CrO₄²⁻ — 0,20–0,25 мМ; а також на багатому середовищі з концентрацією металів: Zn — 3–10 мМ, Co — 3–4 мМ, Ni — 3–5 мМ, Cu — 1–2 мМ, Cd — 1 мМ.

Аналітично чисті солі важких металів — ZnSO₄·7H₂O, CoCl₂·6H₂O, NiCl₂·6H₂O, Cu(NO₃)₂, CdCl₂·6H₂O, K₂CrO₄ (Merck, Німеччина) готували у вигляді 1М стокових розчинів, стерилізували автоклавуванням та додавали у середовища після їх стерилізації.

Аналіз плазмідної ДНК штамів бактерій проводили за методом Екгардта [14]. Виділення плазмідної ДНК здійснювали лужним лізисом за методом Бірнбойма–Долі [15]. RAPD-аналіз плазмідних ДНК виконували за методом [16] з використанням праймерів ОРА-06 та ОРР-12. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) тривала 45 циклів (94 °С — 40 с; 35 °С — 40 с; 72 °С — 1 хв 30 с). Електрофорез плазмідних ДНК здійснювали в 0,8%-му агарозному гелі відповідно до методики [17].

Як стандарт для визначення розміру плазмід використовували нативну ДНК фага λ.

З метою кон'югативного схрещування застосовували прекультури штамів *Ps. fragi* T2(5) та *Ph. phosphoreum* B7071, які вирощували протягом 14 год у 5 мл рідкого живильного середовища Luria–Bertani (LB-бульйону). Клітини кожної культури осаджували центрифугуванням (6 000 об/хв, 10 хв), ресуспендували в 5 мл 0,01 М розчині MgSO₄. Схрещування проводили на LB-агарі, змішуючи по 100 мкл суспензій донора та реципієнта з густиною 10⁸ кл/мл. Культивували протягом 5 год при 28 °С, після чого висівали на селективне трис-мінімальне глюконатвмісне середовище з додаванням 20 мкг/мл тетрацикліну, 0,3 мМ Zn та 3% NaCl. Як

контроль на це саме середовище висівали клітини донора та реципієнта. Результати кон'югативного схрещування аналізували після культивування культур протягом 24 год при 28 °С.

Для підтвердження наявності генів (Zn^{lux+}) у гібридній плазміді одержаних транскон'югатів проводили її елімінацію з використанням інтеркалюючого барвника — бромистого етидію [18, 19], кінцева концентрація якого в середовищі становила 100 мкг/мл.

Тестування елімінантів на чутливість до іонів цинку здійснювали шляхом висівання на трис-мінімальне середовище з концентрацією цинку 0,1–1,0 мМ.

Інтенсивність металіндукованої біоломінесценції клітин штаму-транскон'югату оцінювали за описаною раніше методикою [20].

У роботі було використано трис-гідроксиметиламінометан (Gibco BRL, Шотландія); LB-середовище, пептон, глюконат Na, дріжджовий екстракт, агарозу, бромистий етидій (Sigma, США); праймери: OPA-06 и OPP-12 (Oregon LTD, США). Інші реактиви були вітчизняного виробництва, кваліфікації х. ч. та ч. д. а.

Статистичну обробку результатів експерименту здійснювали згідно [21] з використанням критерію Стьюдента ($p < 0,05$).

Результати та обговорення

Можливість розроблення сенсорних елементів з використанням природної та індукованої здатності бактеріальних клітин реагувати на присутність забруднювачів зміною інтенсивності люмінесценції інтенсивно вивчається останнім часом [22].

Нами було проведено комплексні дослідження щодо можливостей розроблення сенсорних елементів з використанням як аналітичного сигналу зміни інтенсивності біоломінесценції мікроорганізмів під дією важких металів в іонному стані.

Було вивчено вплив іонів важких металів на інтенсивність природної люмінесценції штаму *Ph. phosphoreum* B7071.

Показано, що іони важких металів (Zn, Co та Au) справляють інгібуючий вплив на біоломінесценцію клітин досліджуваного штаму. При цьому встановлено, що найбільш виражена концентраційно-залежна здатність інгібувати інтенсивність люмінесценції бактеріальних клітин притаманна іонам золота: чутливість штаму до дії золота в іонному стані у концентрації 1 та 2,5 мкМ була значно більш вираженою, ніж чут-

ливість до дії іонів Zn та Co у максимально діючій концентрації — 100 мкМ (рис. 1).

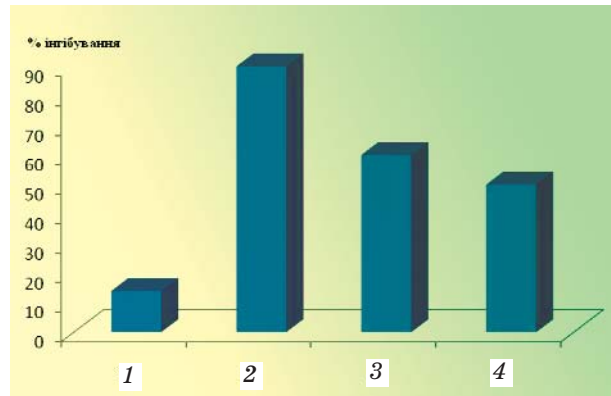


Рис. 1. Ступінь інгібування природної люмінесценції клітин *Photobacterium phosphoreum* B7071 (lux^+) іонами важких металів:

1 — іони Au концентрацією 0,2 мкг/мл (1,0 мкМ);
2 — іони Au концентрацією 0,5 мкг/мл (2,5 мкМ);
3 — іони Zn концентрацією 100 мкМ;
4 — іони Co концентрацією 100 мкМ

Дослідження особливостей впливу іонного золота на біоломінесцентний штам *Ph. phosphoreum* B7071 дозволили встановити, що вже при концентрації 0,12 мкг/мл (0,6 мкМ) за металом відбувалося інгібування бактеріальної люмінесценції більш ніж утричі порівняно з контролем (рис. 2). Це свідчить про значний токсичний вплив іонів Au на процеси життєдіяльності клітин досліджуваного штаму.

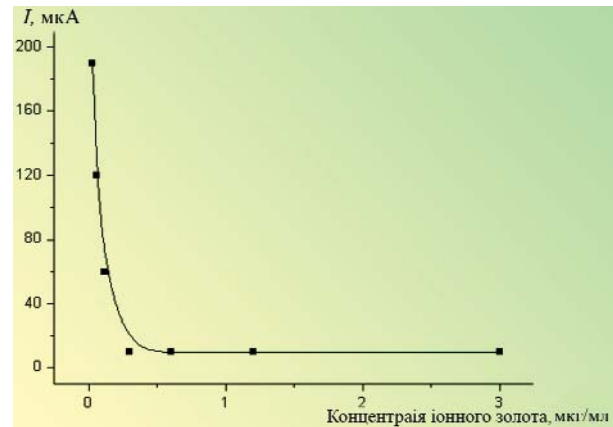


Рис. 2. Вплив іонного золота на інтенсивність біоломінесценції штаму *Ph. phosphoreum* B7071

Висока концентраційно-залежна чутливість штаму *Ph. phosphoreum* B7071 до впливу іонного золота свідчить про можливість використання його як сенсорного елемента при створенні біосенсорів для визначення вмісту іонів золота у водних середовищах.

На користь такої можливості вказують також результати, що їх одержано під час вивчення особливостей кінетики процесу взаємодії іонного золота з клітинами штаму *Ph. phosphoreum* B7071. Кінетичні криві гасіння інтенсивності бактеріальної люмінесценції іонами золота за двох різних значень концентрації (рис. 3) показують «швидку» кінетику цього процесу: протягом 10 хв рівень гасіння біоломінесценції досягав максимального значення і подальше збільшення часу інкубації не впливало на його хід.

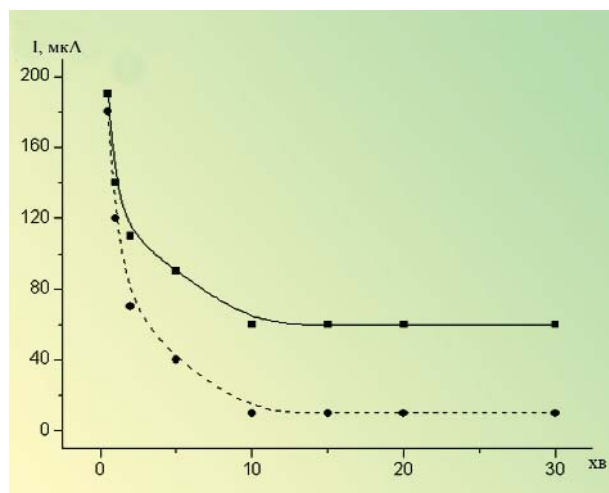


Рис. 3. Кінетика гасіння біоломінесценції *Ph. phosphoreum* B7071 іонами золота за концентрацій (мкг/мл): 0,12 (■) та 0,3 (●)

Таким чином, отримані результати підтверджують можливість застосування ефекту інгібування іонами золота інтенсивності природної біоломінесценції штаму *Ph. phosphoreum* B7071, використаного як сенсорний елемент біоломінесцентного аналізатора для визначення вмісту іонного золота у водному середовищі.

Для подальших досліджень щодо розроблення сенсорних елементів значний інтерес становить штам *Ps. fragi* T2(5). Вивчення стійкості клітин цих бактерій до низки іонів важких металів (Zn — 0,8–2 мМ, Со — 1–2 мМ, Ni — 0,8–2 мМ, Cu — 0,8–1 мМ, Cd — 0,8 мМ, CrO₄²⁻ — 0,20–0,25 мМ) виявило, що штам *Ps. fragi* T2(5) характеризувався високим рівнем резистентності тільки до іонів цинку (таблиця).

Звичайні концентраційні межі біодоступних металів становлять 0,5–20 мМ [23, 24], тож рівень стійкості штаму *Ps. fragi* T2(5) на мінімальному (2,0 мМ) та багатому (10,0 мМ) середовищах є досить високим.

З метою визначення генетичної детермінації стійкості до іонів цинку штаму *Ps. fragi* T2(5) проведено експерименти з виділення та аналізу плазмідної ДНК.

Ріст бактерій *Pseudomonas fragi* T2(5) у присутності іонів цинку

Живильне середовище	Вміст Zn		
	0,8 мМ	1,0 мМ	2,0 мМ
Трис-мінімальне глюконатвмісне середовище	++	++	+–
LB-середовище	3,0 мМ	5,0 мМ	10,0 мМ
	++	++	+–

Примітка: «++» — інтенсивний ріст;
«+–» — помірний ріст.

Встановлено, що клітини досліджуваного штаму містять плазмиду розміром близько 50 т.п.н. (рис. 4, доріжка 2). Як маркер розміру плазмід було використано препарат ДНК фага λ (рис. 4, доріжка 1).

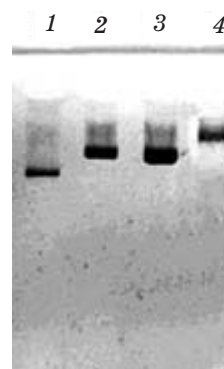


Рис. 4. Розділення плазмід штамів бактерій у 0,8% -му агарозному гелі:

- 1 — маркер молекулярної маси — нативна ДНК фага λ (47 т.п.н.);
- 2 — плазмиди штаму *Ps. fragi* T2(5) (Zn^R);
- 3 — плазмиди штаму *Ph. phosphoreum* B7071;
- 4 — плазмиди штаму *Ps. fragi* T2(5) (Zn^R lux⁺)

Причетність виділеної плазмідної ДНК до детермінації стійкості до іонів цинку було виявлено в результаті експериментів з елімінації цієї плазмиди з подальшою перевіркою резистентності клітин-елімінантів штаму *Ps. fragi* T2(5) до цинку. Для цього 15-ту генерацію культури бактерій, культивування якої проводили на багатому середовищі без вмісту іонів цинку (виключений селективний тиск на бактерії з боку металу), ресуспендували у 10 мМ розчині MgSO₄ та висівали, використовуючи десятикратні розведення, на агаризовані багаті та мінімальні середовища, що містили іони цинку різної концентрації. У результаті було встановлено, що культура втрачала здатність до росту в присутності 0,6 мМ іонів цинку на мінімальному глюконатвмісному середовищі та 1 мМ — на багатому LB-середовищі. Таким чином, виявлена плазмиди є генетичною детермінантою стійкості штаму *Ps. fragi* T2(5) до іонів цинку.

Плазмідний характер резистентності цього штаму до іонів цинку уможлиблює використання його в експериментах з генетичної модифікації з метою отримання транскон'югатів з гібридними плазмідами ($Zn^R lux^+$).

Як донори *lux*-генів було використано клітини штамів *Ph. phosphoreum* B7071. За даними електрофорезу носієм *lux*-генів у цьому штамі є плазмід розміром 50 т. п. н. (рис. 4, доріжка 3). Фенотиповою ознакою цього штаму є здатність до росту в присутності 3%-го розчину NaCl.

Контрольні посіви виявили, що клітини штаму *Ps. fragi* T2(5) не здатні рости на середовищі, яке містить 3%-й NaCl, а присутність іонів цинку в концентрації 0,3 мМ пригнічувала ріст клітин *Ph. phosphoreum* B7071.

Для одержання *lux*-фенотипу штаму з індукованою іонами цинку біолоюмінесценцією застосовували класичний метод кон'югативного схрещування між бактеріями штамів *Ph. phosphoreum* B7071 та *Ps. fragi* T2(5) з подальшою селекцією отриманих транскон'югатів за ознаками стійкості до іонів цинку та високої концентрації NaCl.

Одержаним у результаті процесу кон'югативного схрещування клітинам транскон'югату була притаманна набута здатність до люмінесценції, що є доказом наявності *lux*-генів у гібридній плазміді.

Дослідження вектора переносу генетичного матеріалу свідчать про те, що перенесення *lux*-генів відбулось у клітини *Ps. fragi* T2(5): ріст клітин транскон'югату спостерігався на середовищі, яке містить 0,3 мМ цинку, але не містить 3%-го NaCl.

Для підтвердження цього факту було проведено скринінг плазмід клітин отриманого транскон'югату за методом Екгардта. В результаті експерименту в генетично модифікованих бактерій було виявлено плазмід з більшою електрофоретичною рухливістю, ніж плазмід батьківських штамів (рис. 4, доріжка 4). Характеристику гібридної плазмід ($Zn^R lux^+$), а також плазмід батьківських штамів одержано з використанням RAPD-аналізу. Суть цього методу полягала в ампліфікації поліморфних ділянок ДНК, які визначають видову належність. Було показано, що плазмід акцепторного (Zn^R), донорного (lux^+) та генетично модифікованого штамів ($Zn^R lux^+$) мають різні генетичні профілі (рис. 5).

Утворення гібридної плазмід, яка є носієм генів стійкості до цинку та *lux*-генів, у процесі взаємодії плазмід батьківських штамів підтверджується даними щодо її елімінації. Отримані елімінанти характеризувалися

високою чутливістю до іонів цинку та не виявляли біолоюмінесцентних властивостей.

Створені селективні умови експерименту сприяли відбору таких модифікацій, де регуляція експресії *lux*-генів відбувається промоторно-операторною ділянкою спільно з генами стійкості до цинку. У кінцевому підсумку в гібридному *lux*-опероні цинк виступає як регулятор синтезу бактеріальної люциферази, яка каталізує окиснення аліфатичного альдегіду та відновлення флавінмононуклеотиду молекулярним киснем, унаслідок чого випромінюється світло.

Інтенсивність біолоюмінесценції у цьому процесі є функцією концентрації цинку, з яким контактують клітини такої генетичної конструкції. Це дає змогу використовувати клітини отриманого транскон'югату як сенсорний елемент для кількісного та якісного визначення іонів цинку.

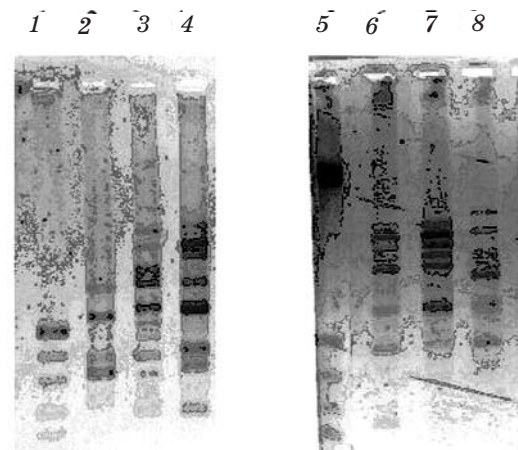


Рис. 5. Розділення продуктів ПЛР, одержаних на плазмідах штамів бактерій за допомогою праймерів ОРА-06 (1–4) та ОРР-12 (5–8) у 1,5%-му агарозному гелі:

- 1 — маркер молекулярної маси pUC19/MspI;
- 2 — *Ps. fragi* T2(5) ($Te^R Zn^R$);
- 3 — *Ph. phosphoreum* B7071;
- 4 — *Ps. fragi* T2(5) ($Zn^R lux^+$);
- 5 — маркери молекулярної маси pUC19/MspI і pUC19/Hind III;
- 6 — *Ps. fragi* T2(5) ($Te^R Zn^R$);
- 7 — *Ph. phosphoreum* B7071;
- 8 — *Ps. fragi* T2(5) ($Zn^R lux^+$)

Аналіз характеру впливу іонів важких металів на інтенсивність біолоюмінесценції клітин генетично модифікованого штаму *Ps. fragi* T2(5) ($Zn^R lux^+$) засвідчив чітко виражену дію іонів цинку (рис. 6, крива 1). Прямолинійна залежність інтенсивності люмінесценції від концентрації цинку зберігається в діапазоні 1–100 мкМ за металом. Хід кривих 2–6 свідчить про незначний рівень чутливості клітин транскон'югату до інших важких металів.

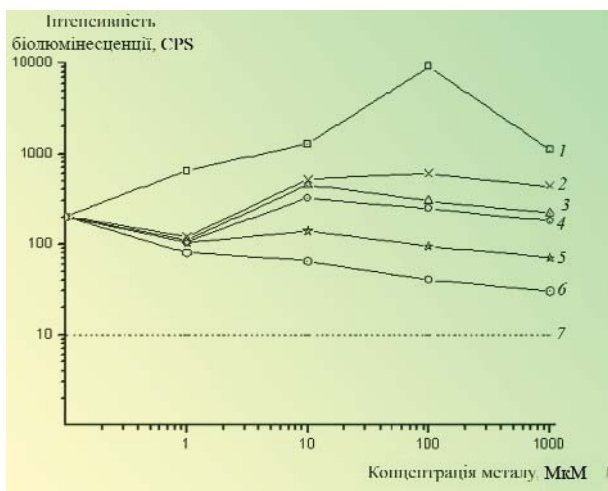


Рис. 6. Інтенсивність специфічної біоломінесценції (CPS-кількість фотонів за секунду) клітин штаму-біосенсора *Ps. fragi* T2(5) ($Zn^R lux^+$) у присутності іонів важких металів:

- 1 — Zn; 2 — Ni;
3 — Co; 4 — Cd;
5 — Cu; 6 — Ag

Отже, можна констатувати високу специфічність клітин одержаного транскон'югату. Крива 1 може розглядатися як калібрувальна для іонів цинку у разі його кількісного визначення.

ЛІТЕРАТУРА

1. Подгорский В. С., Касаткина Т. П., Лозовая О. Г. Дрожжи — биосорбенты тяжелых металлов // Микробиол. журн. — 2004. — Т. 66, №1. — С. 91–103.
2. Лозовая О. Г., Касаткина Т. П., Подгорский В. С. Влияние хрома (VI) на физиологию роста и сорбционную способность дрожжей // Там же. — 2004. — Т. 66, №3. — С. 43–50.
3. Губський Ю. І., Ерстенюк Г. М. Вивчення компонентів системи гемоглобіну та антиоксидантних ферментів за кадмієвої інтоксикації // Укр. біохім. журн. — 2002. — Т. 74, №5. — С. 124–127.
4. Благой Ю. П. Взаимодействие ДНК с биологически активными веществами (ионами металлов, красителями, лекарствами) // Соросовский образовательный журнал. — 1998. — №10. — С. 18–24.
5. Давыдова С. Л. О токсичности ионов металлов. — М.: Знание, 1991. — 32с.
6. Методы анализа объектов окружающей среды: Сб. научн. тр. АН СССР / Под ред. В. В. Малахова. — Новосибирск: Наука. Сиб. Отделение, 1988. — 141 с.
7. Хроматографический анализ окружающей среды / Под ред. З. Л. Гроба. Перевод с англ. — М.: Химия, 1979. — 606 с.

Фоновий рівень біоломінесценції (середовище виміру) відображено на кривій 7.

Відношення максимального сигналу (рис. 6, крива 1) до фонового (рис. 6, крива 7) становить близько трьох порядків.

Таким чином, у результаті проведених комплексних досліджень встановлено: по-перше, ефект інгібування іонами золота інтенсивності природної люмінесценції штаму *Ph. phosphoreum* B7071. Тому клітини цього штаму можуть слугувати сенсорним елементом для визначення вмісту іонного золота, наприклад у стічних водах золотодобувних та золотопереробних підприємств з метою контролю додержання технологічних процесів. По-друге, клітини транскон'югату, отримані в результаті кон'югативного схрещування, здатні високоспецифічно випромінювати світло під час контакту з іонами цинку. Це уможливило використання їх як сенсорного елемента в біоломінесцентному визначенні якісного та кількісного вмісту цього металу в об'єктах довкілля.

8. Yu Lei, Wilfred Chen, Ashok Mulchandani. Microbial biosensors // Anal. Chim. Acta. — 2006. — 568. — P. 200–210.
9. Расторгуев С. М., Завильгельский Г. Б. Lux-биосенсор для детекции ионов мышьяка // Биотехнология. — 2001. — №2. — С. 77–82.
10. Асриэли Т. В., Власова И. И., Гаврилова Е. М., Данилов В. С. Влияние антибиотиков на люминесценцию рекомбинантных клеток *Escherichia coli*, активированных сывороткой крови // Там же. — 2002. — №2. — С. 85–93.
11. Corbisier P., Ji G., Nuyts G. et al. luxAB gene fusion with the arsenic and cadmium resistance operons of *Staphylococcus aureus* plasmid p128 // FEMS Microbiol. Lett. — 1993. — V. 110. — P. 231–238.
12. Van der Lelie D., Corbisier P., Mergeay M. The use of biosensors for environmental monitoring // Res. Microbiol. — 1994. — V. 145. — P. 67–74.
13. Кацев А. М., Стародуб Н. Ф. Влияние поверхностно-активных веществ на интенсивность люминесценции бактерий // Укр. биохим. журн. — 2003. — Т. 75, №2. — С. 94–99.
14. Eckhardt T. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria // Plasmid. — 1978. — V. 1, N4. — P. 584–588.

15. Birnboim H., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // *Nucleic Acids Res.* — 1979. — V. 7, №6. — P. 1513–1523.
16. Welsh J., McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers // *Nucleic Acids Res.* — 1990. — V. 18, N24. — P. 7213–7218.
17. Маниатис Т., Фрич Э., Сембрук Д. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — 480 с.
18. Bouanchaud D., Scauzzi M., Chabbert Y. Elimination by ethidium bromide of antibiotic resistance in Enterobacteria and Staphylococci // *J. Gen. Microbiol.* — 1969. — V. 54. — P. 417–425.
19. Trevors T. Plasmid curing in bacteria // *FEMS Microbiol. Rev.* — 1986. — V. 32. — P. 149–157.
20. Грузина Т. Г., Дыбкова С. Н., Чеховская Т. П. и др. Получение биолюминесцентного бактериального штамма *Photobacterium phosphoreum* B7071 (*lux*⁺) для определения концентрации ионов цинка // *Укр. биохим. журн.* — 2006. — Т. 78, №1. — С. 143–148.
21. Лакин Г. Ф. Биометрия: учебное пособие для биологических специальностей ВУЗов. — М.: Высш. школа, 1990. — 352 с.
22. Решетилов А. Н. Микробные, ферментные и иммунные биосенсоры для экологического мониторинга и контроля биотехнологических процессов // *Прикл. биохим. микробиол.* — 2005. — Т. 41, №5. — С. 504–513.
23. Gerhardt P., Murray R., Wood W. *Plasmids // Methods for general and molecular bacteriology.* Amer. Soc. of Microbiol. — Washington DC, 1993. — P. 124–128
24. Сатаева Л. В., Малахов С. Г. Загрязнения почв металлами в зависимости от типа преобладающей промышленности // *Труды ин-та эксперимент. метеорол.* — 1991. — Вып. 18. — С. 3–8.

**БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ БАКТЕРИИ
КАК СЕНСОРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ
ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ**

А. М. Задорожня, Т. Г. Грузина
С. Н. Дыбкова, З. Р. Ульберг

Институт биокolloидной химии
им. Ф. Д. Овчаренко НАН Украины, Киев,

E-mail: tguzina@mail.ru

Выявлен дозозависимый эффект ингибирования ионами золота интенсивности природной люминесценции штамма *Photobacterium phosphoreum* B7071 (*lux*⁺). Клетки этих бактерий могут выступать в качестве сенсорного элемента для определения содержания ионного золота, например в сточных водах золотодобывающих и золотоперерабатывающих предприятий, с целью контроля соблюдения технологических процессов.

В результате конъюгативного скрещивания получены клетки трансконъюгата *Pseudomonas fragi* T2(5), которые содержат гибридную плазмиду (*Zn^Rlux⁺*) и способны высокоспецифично испускать свет при контакте с ионами цинка. Это дает возможность использовать их как сенсорный элемент в биолюминесцентном определении качественного и количественного содержания этого металла в объектах окружающей среды.

Ключевые слова: бактерии, природная биолюминесценция, индуцированная биолюминесценция, определение, золото, цинк, конъюгативное скрещивание.

**BIOLUMINESCENT BACTERIA
AS SENSOR ELEMENTS FOR THE HEAVY
METALS IONS' CONTENT DETECTION**

A. M. Zadorozhnyaya
T. G. Gruzina
S. M. Dibkova
Z. R. Ulberg

Ovcharenko Institute of Biocolloidal Chemistry
of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: tguzina@mail.ru

It has been shown the dose-dependent inhibition influence of gold ions on *Photobacterium phosphoreum* B7071 (*lux*⁺) natural luminescence. These bacterial cells can serve as a sensor element for ionic gold content detection, for example, in wastewater of gold-mining and gold-processing manufactures for requirements compliance control.

The *Pseudomonas fragi* T2(5) transconjugates, which contain hybrid plasmid (*Zn^Rlux⁺*) and which are capable of the high-specific of light emission as a result of the contact with zinc ions, have been derived by conjugate crossing method. It enables to use these transconjugates as sensor elements in the high-specific bioluminescent detection of qualitative and quantitative content of this metal in environmental objects.

Key words: bacteria, natural bioluminescence, induced bioluminescence, detection, gold, zinc, conjugate crossing.

НОВІ МЕТОДИ

УДК 577.15.543.555

ФЕРМЕНТНИЙ КОНДУКТОМЕТРИЧНИЙ БІОСЕНСОР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ЛАКТОЗИ

Пешкова В. М.^{1,2}
Саяпіна О. Я.^{1,3}
Солдаткін О. О.¹
Кукла О. Л.⁴
Дзядевич С. В.¹

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ
²Київський національний університет імені Тараса Шевченка
³Національний університет харчових технологій, Київ
⁴Інститут фізики напівпровідників ім. В. Є. Лашкарьова
НАН України, Київ

E-mail: victoir@ukr.net

Розроблено ферментний кондуктометричний біосенсор для визначення лактози. Роль біочутливого елемента виконує триферментна мембрана (глюкозооксидаза, мутаротаза, β -галактозидаза), що іммобілізована на поверхню кондуктометричного перетворювача. Досліджено робочі характеристики біосенсора. Час визначення концентрації лактози в розчині становив 1–2 хв, лінійний діапазон роботи біосенсора — від 0,01 мМ до 0,75 мМ для глюкози та від 0,01 мМ до 1,25 мМ для лактози. Встановлено залежність величини відгуку біосенсора на внесення субстрату від рН, іонної сили та буферної ємності робочого розчину, наведено дані щодо селективності біосенсора та його стабільності під час зберігання. Розроблений кондуктометричний біосенсор характеризується високою операційною стабільністю та відтворюваністю сигналу.

Ключові слова: кондуктометричний ферментний біосенсор, лактоза, глюкоза, глюкозооксидаза, мутаротаза, β -галактозидаза.

Унікальні властивості лактози зумовлюють широке застосування її у мікробіології, аналітичній хімії, харчовій промисловості, фармакології тощо. Зараз лактозу інтенсивно використовують у виробництві дитячого харчування та замінників жіночого молока. Також її широко застосовують у виробництві медичних препаратів, антибіотиків та харчових продуктів. У процесі виготовлення медичних препаратів рафінований молочний цукор використовують як інертний наповнювач, розріджувач або активний компонент. У свою чергу, сирець чи кристаліза́т молочного цукру (45% лактози) є одним із головних компонентів середовищ для ферментації у виробництві антибіотиків. Очищений (харчовий) молочний цукор використовується у харчовій промисловості для виготовлення різних видів карамелі, шоколаду, джемів, мармеладу, бісквітів, цукерок, глазури, діабетичних продуктів, м'ясних виробів тощо. У хлібопекарській промисловості лактозу застосовують для збільшення об'єму хліба та здобних виробів. Виявлено, що лактоза стабілізує та покращує колір, смак і запах різних конди-



терських виробів. Завдяки цим властивостям її використовують у виробництві смакових та ароматичних добавок. Помічено, що додавання лактози у м'ясні продукти маскує їхній солоний та гіркий присмак, поліпшує стабільність продукту під час зберігання. Часткова заміна сахарози на лактозу зменшує солодкість і особливо посилює смак фруктів та ягід у джемах і мармеладах. Використання лактози у виробництві алкогольних напоїв підсилює та одночасно пом'якшує їхній смак.

В організмі лактоза сприяє всмоктуванню кальцію, магнію, марганцю, має біфідогенні властивості (підтримує ріст біфідобактерій), також інгібує ріст патогенної мікрофлори кишечника.

Для кисломолочних бактерій лактоза є основним джерелом енергії, що спричинює молочнокисле бродіння, унаслідок якого отримують багато кисломолочних продуктів. Також у молочноконсервному виробництві лактозу використовують як затравку для кристалізації у виробництві згущеного молока.

Вихід та якість молочних продуктів, що визначаються складом молока, концентрацією, структурою і властивостями його компонентів, перебувають у прямій залежності від зоотехнічних факторів та стану тварин (кормовий раціон, здоров'я тварин, лактаційний період тощо). У свою чергу, вміст лактози, що є одним з основних компонентів молока та молочних продуктів, — важливий показник якості молочних продуктів. До того ж на сьогодні у багатьох людей є лактозна недостатність (вроджений чи набутий стан, що характеризується зниженням рівня ферменту лактази, яка розщеплює лактозу до глюкози та галактози). Клінічним виявом цієї хвороби є інтолерантність до лактози [1].



У зв'язку з усім вищезазначеним цілком очевидно, що на сьогодні існує потреба в добре налагодженій системі моніторингу концентрації лактози, передусім у складі молочних продуктів на молочному виробництві, а також у багатьох інших галузях (медичне, харчове виробництво). Більш того, визначення лактози може знадобитися в ензимології та мікробіології для більш детального вивчення процесів ферментації, молочнокислого бродіння тощо. Сучасні стандартні методи високоточного визначення лактози потребують наявності кваліфікованого персоналу та складного і дорогого обладнання, яке є необхідним для рідинної, газової хроматографії, хімічних, гравіметричних та оптичних методів [2]. Ще одним недоліком наведених вище методів є необхідність у досить складній попередній підготовці проб для аналізу. Інші методи, такі як поляриметрия та рефрактометрия, є простими і швидкими, але менш точними та селективними. На противагу їм біосенсори є більш зручними, точними, селективними, швидкими та дешевими приладами. Створення біосенсора для визначення лактози може спростити та поліпшити систему моніторингу вмісту лактози в молочних продуктах та медичних препаратах.

На сьогодні існує низка лабораторних прототипів біосенсорів для визначення лак-

този [3–16]. Більшість із них є амперометричними з різними іммобілізованими на поверхню електродів ферментами: β -галактозидаза та галактозооксидаза [3], β -галактозидаза та глюкозооксидаза (ГОД) [2, 4–7], пероксидаза хрину, глюкозооксидаза та β -галактозидаза [8], β -галактозидаза, мутаротаза та глюкозодегідрогеназа [9], β -галактозидаза, галактозодегідрогеназа [10–12], целобіозодегідрогеназа [13].

Деякі автори також повідомляють про розроблення біосенсорів для визначення лактози з використанням різних медіаторів [8, 14], що дещо ускладнює систему визначення. Наприклад, у роботі [14] як робочий електрод використовували графітовий електрод з адсорбованим на нього медіатором ферроценом, а в роботі [8] медіатором слугувала аміносаліцилова кислота.

В іншій роботі [15] автори інформують про створення біосенсора для визначення лактози на основі мікробіологічних клітин *Kluyveromyces marxianus*, які містили фермент β -галактозидазу, та клітини *Glucobacter oxydans* з ферментом ГОД. Ці клітини були іммобілізовані з желатином на поверхні електродів за допомогою глутарового альдегіду. Перевага такого клітинного біосенсора полягала в тому, що клітини *Glucobacter oxydans* були здатні окиснювати обидва аномери глюкози, що давало змогу обходитись без ферменту мутаротази. Крім того, авторами було відзначено, що додавання DEAE-декстрану та інозиту до біоселективної мембрани біосенсорів підвищувало стабільність біосенсорів у 16 разів порівняно зі стабільністю біосенсорів без стабілізаторів.

У роботі [5] є повідомлення про створення амперометричного мультибіосенсора для визначення декількох сахаридів (лактози, мальтози, сахарози та глюкози). Авторами було показано також, що активність ферменту β -галактозидази в желатиновій мембрані більша, ніж в альбуміновій. Є також інформація [16] про розроблення біосенсора на основі ІСПТ для визначення лактози, до складу якого входила термофільна глюкочіназа та β -галактозидаза. Ферменти не втрачали активності при температурі +50 °С. Авторами статті [7] було розроблено амперометричний мультибіосенсор для визначення глюкози, галактози та лактози і здійснено його



успішну апробацію на практиці для визначення цих сахаридів у молоці.

Отже, на сьогодні більшість розроблених біосенсорів для визначення лактози є амперометричними [3–15]. Однак порівняно з кондуктометричними біосенсорами вони мають низку недоліків. Передусім це вимірювання з використанням високого потенціалу, що призводить до фарадеївських процесів на електродах та похибок через присутність у розчинах інших електроокиснювальних компонентів, таких, наприклад, як аскорбінова кислота. По-друге — необхідність у технологічно складному та дорогому електроді порівняння. До того ж, вартість амперометричних біосенсорів, як правило, є вищою порівняно з кондуктометричними.

Загалом, порівняно з іншими електрохімічними біосенсорами кондуктометричні методи аналізу є достатньо простими, зручними, точними і дозволяють вирішити низку важливих науково-дослідних та виробничих завдань [17–19]. Тому метою цієї роботи було розроблення кондуктометричного ферментного біосенсора для визначення лактози та вивчення його робочих характеристик.

Матеріали і методи

У дослідженнях використовували препарати ліофілізованих ферментів: глюкозооксидазу (ГОД) з *Penicillium vitale* (ЕС 1.1.3.4.) з активністю 130 од. акт./мг фірми «Діагностикум» (Львів, Україна); мутаротазу (ЕС 5.1.3.3.) з активністю 100 од. акт./мг фірми Biozyme Laboratories Ltd (Англія), β-галактозидазу (ЕС 3.2.1.23.) з активністю 149 од. акт./мг з *E.coli* фірми Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Німеччина). Бичачий сироватковий альбумін (БСА) (фракція V) та 50%-й водний розчин глутарового альдегіду (ГА) було отримано від фірми Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Німеччина). Як субстрат застосовували лактозу та глюкозу, як буферний розчин — калійфосфатний розчин ($\text{K}_2\text{HPO}_4\text{--NaOH}$) фірми Merck (Німеччина). Інші неорганічні сполуки, що використовували в роботі, були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти «х. ч.» та «ч. д. а.».

У роботі було застосовано кондуктометричні перетворювачі, виготовлені в Інституті фізики напівпровідників ім. В. Є. Лашкарьова (Київ). Вони складаються з двох ідентичних пар золотих гребінчастих електродів, виготовлених вакуумним напиленням золота на основу із ситалу розміром 5×40 мм (рис. 1). Чутлива поверхня кожної

електродної пари становила приблизно 1,0×1,5 мм. Відстань між пальцями гребінок та ширина самих пальців гребінок — 20 мкм.



Рис. 1. Зовнішній вигляд кондуктометричних планарних гребінчастих перетворювачів

Виготовлення біоселективних мембран

Для виготовлення біоматриць за основу було взято метод іммобілізації ферментів за допомогою глутарового альдегіду [20]. Створюючи сенсори для визначення лактози, готували розчин зі вмістом 6% β-галактозидази, 8% мутаротазу, 6% ГОД, 20% гліцеролу у 20 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,4. Розчин для референтної мембрани робили таким же чином, але замість наважки ферментів брали 20% БСА. Обидві мембрани мали однаковий вміст білка. Перед нанесенням ці розчини змішували з 1%-м водним розчином ГА у співвідношенні 1:1. Після нанесення мембран на поверхню електродів сенсори висувували протягом 1 год на повітрі при кімнатній температурі. Перед початком роботи біосенсор відмивали від надлишку ГА буферним розчином, в якому й проводили подальші дослідження.

Експериментальна установка

Блок-схему вимірювальної установки зображено на рис. 2. З низькочастотного генератора сигналів ГЗ-118 (Україна) подається змінна напруга з частотою 100 кГц та амплітудою 10 мВ на гребінчасті електроди (диференційна пара), які містяться в комірці з досліджуваним розчином. Отриманий на електродах сенсора сигнал знімається з опор навантаження $R_n = 1$ кОм та надходить через диференційний підсилювач Unipan-233-6 (Польща) на селективний нановольтметр Unipan-233 (Польща). Після вольтметра цей сигнал подається на реєструвальний пристрій. У ході експериментів вимірювали залежність амплітуди вихідного сигналу від концентрації субстрату в розчині.

Методика вимірювання

Вимірювання проводили у калійфосфатному буферному розчині різної молярності за різних значень рН при кімнатній темпе-

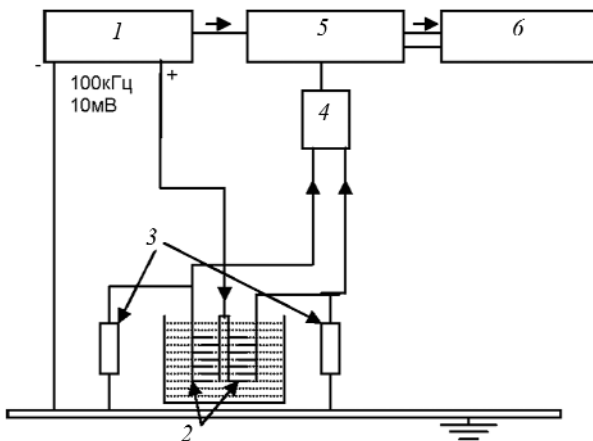


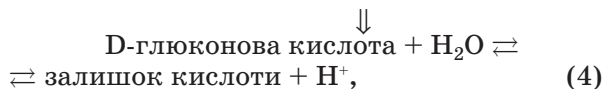
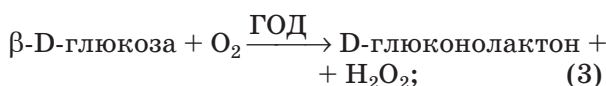
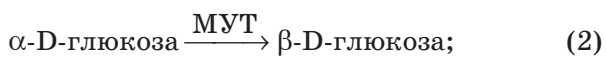
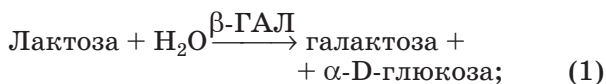
Рис. 2. Схема експериментальної установки для кондуктометричних вимірювань:

1 — генератор; 2 — електроди; 3 — опори навантаження; 4 — диференційний підсилювач; 5 — фазочутливий нановольтметр; 6 — реєструвальний пристрій

ратурі у відкритій комірці з інтенсивним перемішуванням. Спочатку сенсор розміщували у комірці для вимірювання об'ємом 2 мл, заповненій фосфатним буферним розчином. Для одержання стабільного початкового сигналу (базової лінії) сенсор вимочували деякий час у буферному розчині. Потім для отримання сигналу на субстрат необхідної концентрації в комірку додавали певну аліквоту стандартного концентрованого вихідного розчину субстрату. Неспецифічні зміни вихідного сигналу, пов'язані з коливаннями температури, рН середовища, коливаннями напруги в мережі, нівелювалися завдяки використанню в роботі диференційного режиму вимірювань, тобто вимірювали різницю сигналів із двох пар електродів з активною та неактивною мембраною, розташованих на одному перетворювачі.

Результати та обговорення

В основі роботи кондуктометричної біосенсорної системи для визначення лактози лежить каскад ферментативних реакцій:



де β -ГАЛ — β -галактозидаза, МУТ — мутаротаза, ГОД — глюкозооксидаза.

β -Галактозидаза, мутаротаза та глюкозооксидаза поетапно розщеплюють лактозу до пероксиду водню та D-глюконолактону. Глюконолактон, у свою чергу, спонтанно гідролізується до глюконової кислоти, яка дисоціює на залишок кислоти і протон, при цьому змінюється провідність розчину, яку й можна реєструвати за допомогою кондуктометричного перетворювача [16]. На рис. 3 наведено типові відгуки кондуктометричного біосенсора на додавання у комірку лактози та глюкози.

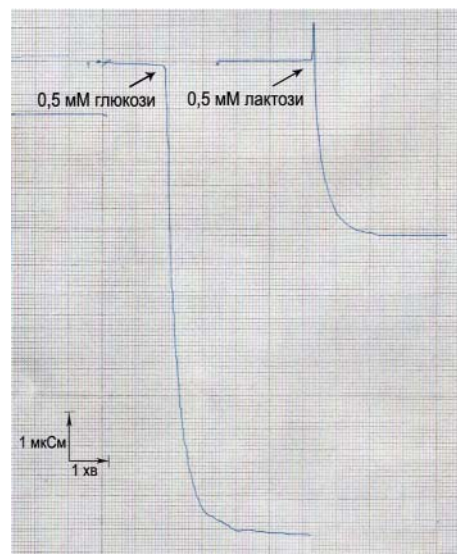


Рис. 3. Відгуки кондуктометричного біосенсора на додавання у комірку 0,5 мМ лактози та 0,5 мМ глюкози. Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,0.

На рис. 4 подано графіки залежності зміни провідності від концентрації глюкози (1) та лактози (2) лактозного біосенсора. Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5. З рисунка видно, що лінійний діапазон роботи біосенсора — до 0,75 мМ для глюкози й до 1,25 мМ для лактози. Мінімальна концентрація, яку можна було визначати біосенсором, становила 0,01 мМ для глюкози та лактози.

Оскільки лактозний сенсор дає відгук і на глюкозу, і на лактозу, для визначення саме лактози необхідною є наявність також глюкозного сенсора. У зв'язку із цим вимірювання лактози в зразках слід проводити у два етапи. Спочатку визначаємо концентрацію глюкози в зразку глюкозним сенсором, а потім — сумарну концентрацію лактози і глюкози у досліджуваному розчині за допомогою лактозного сенсора. Різниця цих двох концентрацій відповідає концентрації лактози в розчині. У перспективі в разі

використання перетворювача з трьома парами кондуктометричних електродів матимемо можливість вимірювати ці величини одночасно.

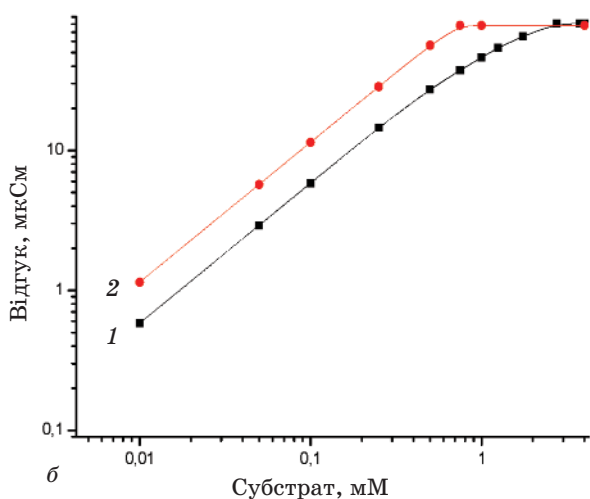
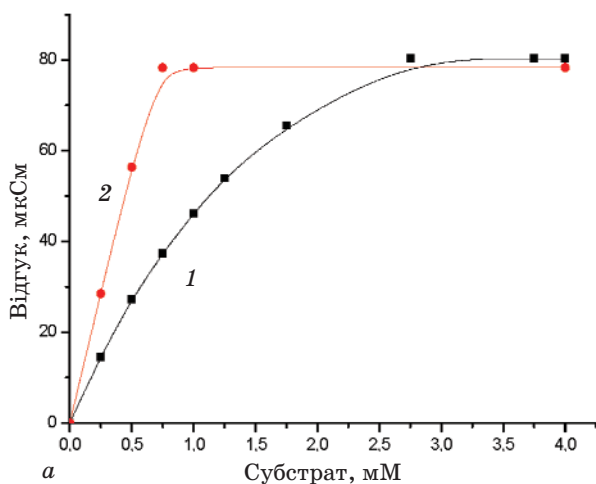


Рис. 4. Графіки залежності зміни провідності від концентрації лактози (1) та глюкози (2) лактозного біосенсора в лінійній (а) та логарифмічній шкалі (б).
Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5

В основі кондуктометричного методу, як відомо, лежить вимірювання зміни провідності аналізованого розчину. Ця зміна провідності може залежати як від самої ферментативної реакції, так і від характеристик розчину, в якому ця реакція відбувається. Тому передусім було досліджено вплив параметрів розчину (іонна сила, буферна ємність, рН) на величину відгуку нашого сенсора.

На рис. 5 показано залежність величин відгуків біосенсора від концентрації лактози у буферних розчинах різної концентрації. З рисунка випливає, що зі зміною концентрації буферного розчину змінюють-

ся величини відгуків біосенсора та лінійний діапазон визначення. У випадку роботи біосенсора в 20 та 30 мМ фосфатному буферному розчині чутливість біосенсора щодо лактози значно падала та лінійний діапазон визначення лактози зменшувався.

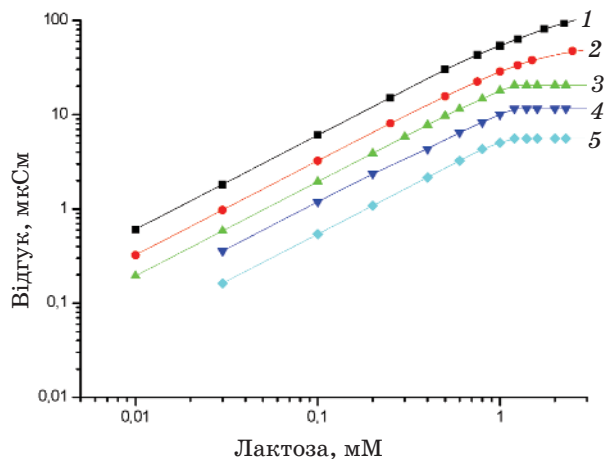


Рис. 5. Залежність величин відгуків біосенсора від концентрації лактози у фосфатному буферному розчині (рН 6,5) різної концентрації: 5 мМ (1), 10 мМ (2), 15 мМ (3), 20 мМ (4), 30 мМ (5)

На рис. 6 наведено залежність величин відгуків біосенсора на внесення 0,1 мМ глюкози та 0,1 мМ лактози від різних концентрацій буферного розчину. Також подано залежність співвідношень відгуків на 0,1 мМ глюкози та 0,1 мМ лактози від різних концентрацій буферного розчину. З графіка видно, що зі збільшенням буферної ємності співвідношення відгуків на 0,1 мМ глюкози та 0,1 мМ лактози наближується до одиниці, але водночас величина відгуків на глюкозу та лактозу зменшується. Зниження відгуків на субстрат у разі збільшення концентрації буферного розчину пов'язано зі зростанням фонові провідності та буферної ємності розчину, що слід врахувати під час проведення аналізів.

Однією з важливих характеристик буферного розчину, що може негативно впливати на вимірювання кондуктометричного біосенсора, є іонна сила. Щоб дослідити цей вплив, було проведено вимірювання величини сигналу на одну концентрацію субстрату (0,8 мМ лактози) із додаванням у розчин різних концентрацій КСl (до 50 мМ) (рис. 7). З отриманого графіка видно, що зі збільшенням іонної сили відгук на концентрацію субстрату зменшується за експонентою: спочатку спостерігається значне зменшення величини відгуків біосенсора, а при концентрації 20–50 мМ КСl величина сигналу становить менше 1% від початкового відгу-

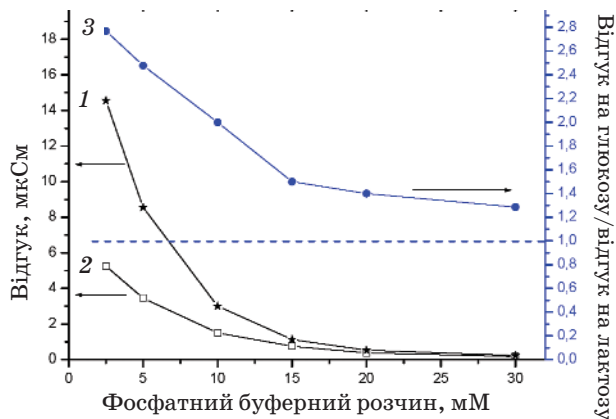


Рис. 6. Залежність величин відгуків біосенсора на 0,1 мМ глюкози (1) і 0,1 мМ лактози (2) та співвідношення відгуків на 0,1 мМ глюкози та 0,1 мМ лактози (3) від буферних розчинів різної концентрації

ку на лактозу без додавання KCl у комірку. Одна з головних причин такої залежності пов'язана зі зростанням фонові провідності розчину. Тому в разі проведення вимірювань за допомогою кондуктометричного біосенсора вкрай важливим є контроль іонної сили аналізованих зразків.

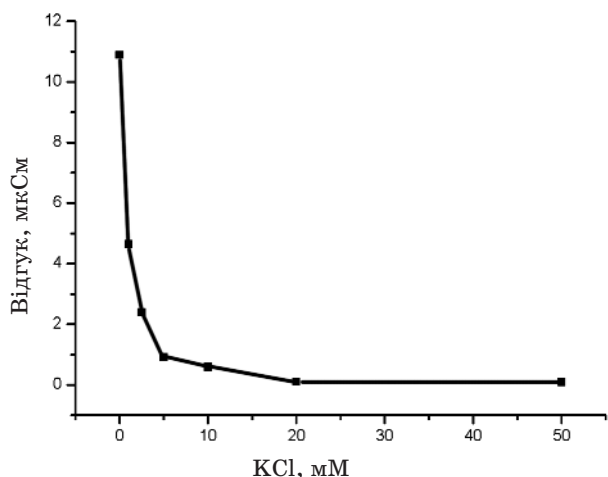


Рис. 7. Залежність величини відгуку кондуктометричного біосенсора для визначення лактози на внесення 0,8 мМ лактози у розчин від концентрації KCl у 10 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5

Як відомо, кожен фермент має рН-оптимум своєї роботи. Деякі ферменти після їх іммобілізації можуть змінювати свій рН-оптимум, зсуваючи його або в лужну, або в кислу ділянки. У нашому випадку маємо суміш трьох іммобілізованих на поверхню сенсора ферментів з різними рН-оптимами. Тому наступним завданням було знайти оптимальний рН буферного розчину для роботи всіх ферментів, а відповідно й кондук-

тометричного біосенсора для визначення лактози. У даному експерименті ми не використовували універсальний буферний розчин, до складу якого входить боратний буферний розчин, тому що в присутності солей борату лактоза ізомеризується в лактулозу, а це, у свою чергу, призводить до зниження сигналу на лактозу приблизно вдвічі [14]. Оскільки активність роботи лактозного біосенсора у фосфатному буферному розчині є вищою, ніж в ацетатному [5], виміри проводили у фосфатному буферному розчині з різним рН (від 5,0 до 8,0). Графіки залежності величин сигналів на внесення 0,5 мМ лактози та 0,5 мМ глюкози від рН мали дзвоникоподібну форму з максимумом при рН 6,5 та рН 5,5 відповідно (рис. 8).

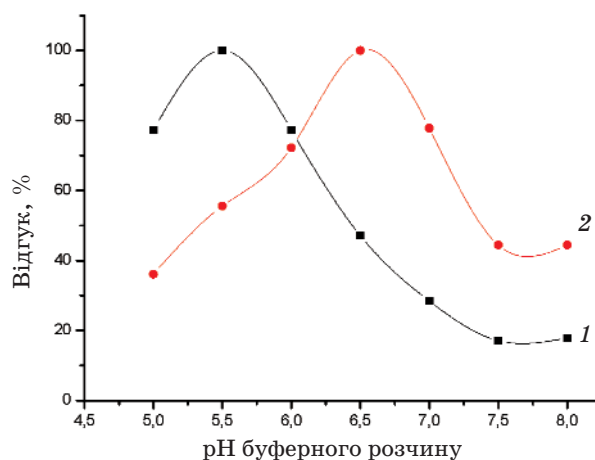


Рис. 8. Графік залежності відгуків лактозного біосенсора від рН розчину в разі додавання 0,5 мМ глюкози (1) та 0,5 мМ лактози (2). Вимірювання проводили в 10 мМ фосфатному буферному розчині. За 100% взято максимальну величину відгуків відповідного субстрату

Одержані нами результати узгоджуються з даними інших дослідників. Наприклад, у статті [8] було показано, що найвищі відгуки лактозного біосенсора отримано в діапазоні рН 6,0–6,2 фосфатного буферного розчину. Автори роботи [5] повідомляють про те, що рН-оптимум роботи їхнього лактозного сенсора у фосфатному буферному розчині дорівнював 6,5. Активність біосенсора та його рН-оптимум можуть змінюватися залежно від умов іммобілізації та типу буферного розчину. В нашому випадку оптимальним для роботи біосенсора є значення рН фосфатного буферного розчину 6,5. Це пов'язано з тим, що β-ГАЛ та МУТ мають оптимум роботи при рН 7,5, а ГОД — при рН 5,5, тому оптимальне значення рН для

функціонування цих трьох ферментів дорівнює середньому значенню рН-оптимумів усіх трьох ферментів.

Одними з найважливіших характеристик біосенсорів є операційна стабільність та відтворюваність сигналу. Протягом кожного з чотирьох робочих днів з інтервалом 30 хв отримували відгук біосенсора на одну концентрацію лактози (0,15 мМ), при цьому сенсор весь час між вимірюваннями залишався у буферному розчині з постійним перемішуванням. Вибрана для досліджень концентрація лактози знаходилася на лінійному відрізку калібрувальної кривої біосенсора. З рис. 9 видно, що сенсор характеризувався високою відтворюваністю сигналу.

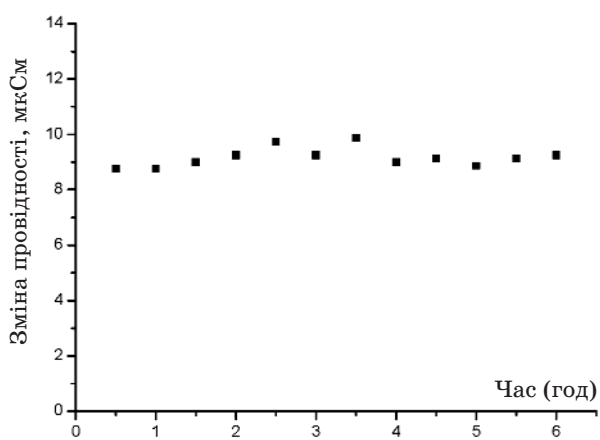


Рис. 9. Операційна стабільність сенсора для визначення лактози.

Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5, у комірку вносили 0,15 мМ лактози

З метою можливої подальшої комерціалізації розробленого біосенсора було проведено низку дослідів з вивчення стабільності біосенсорів під час зберігання (рис. 10). Біосенсори зберігалися при температурі +4 °С в сухих умовах. На перший день після створення лактозних біосенсорів отримали відгук на внесення 0,15 мМ лактози, величину якого було прийнято за 100%. Подальші виміри проводили через певний проміжок часу (3–8 днів). Відгук біосенсора знизився на 22% упродовж трьох місяців, що є дуже високим показником стабільності.

Для проведення в подальшому робіт з реальними зразками слід було також здійснити перевірку селективності розробленого лактозного біосенсора, тому було проведено низку дослідів із вивчення впливу інтерферуючих компонентів на відгук лактозного біосенсора. Дослідження проводили в 10 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5, в експериментальну комірку вносили роз-

чин з 0,5 мМ можливої інтерферуючої речовини (таблиця). Відгук сенсора розраховували у процентах, причому за 100% було обра-но відгук сенсора на 0,5 мМ лактози.

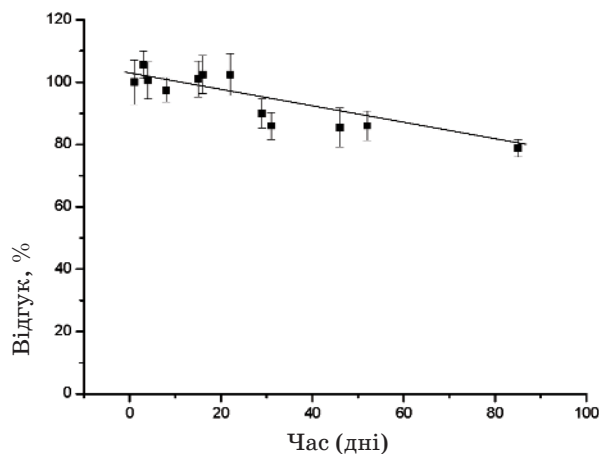


Рис. 10. Стабільність біосенсора для визначення лактози під час зберігання його в сухих умовах при температурі +4 °С.

Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5; у комірку вносили 0,15 мМ лактози

Загалом, лактозний біосенсор виявився селективним стосовно низки інтерферуючих речовин, які можуть бути присутні у зразках, за винятком глюкози та мальтози. Відгук лактозного біосенсора на глюкозу є цілком очікуваним, оскільки до складу ферментної мембрани цього біосенсора входить глюкозооксидаза. Тому для визначення саме лактози у зразках, в яких може бути присутня глюкоза, необхідним є другий сенсор, чутливий тільки до глюкози.

Відгук кондуктометричного лактозного біосенсора на 0,5 мМ мальтози становить 8% від величини відгуку на таку саму концентрацію лактози. Оскільки в подальшому передбачається використовувати лактозний сенсор в основному для визначення лактози в молочних продуктах, де, як правило, мальтоза відсутня, то ця чутливість сенсора стосовно мальтози не буде впливати на точність аналізу.

Селективність біосенсора для визначення лактози

1мМ субстанції	Відносний відгук біосенсора, %
Лактоза	100,0
Глюкоза	172,5
Мальтоза	8,0
Сахароза	0
Фруктоза	0
Арабіноза	0
Маноза	0

Отже, створено кондуктометричний біосенсор для визначення лактози, в якому триферментна мембрана відіграє роль чутливого елемента, та досліджено його аналітичні характеристики у процесі роботи з модельними зразками (залежність відгуку від рН, іонної сили та буферної ємності робочого розчину). Розроблений кондуктометричний біосенсор характеризується високою операційною стабільністю та відтворюваністю сигналу.

Надалі передбачається відпрацювання методики визначення лактози в реальних зразках (зокрема, в кисломолочних продуктах).

Роботу виконано за фінансової підтримки НАН України в рамках комплексної науково-технічної програми «Сенсорні системи для медико-екологічних та промислово-технічних потреб».

ЛІТЕРАТУРА

1. Fox A., Thomson M. Adverse reactions to cows' // Milk Symposium: Metabolic Medicine. — 2007. — V. 17, N7. — P. 288–294.
2. Jager A., Bilitewski U. Screen-printed Enzyme Electrode for the Determination of Lactose // Analyst. — 1994. — V. 119, N6. — P. 1251–1255.
3. Sharma S. K., Singhal R., Malhotra B. D., Sehgal N. Lactose biosensor based on Langmuir-Blodgett films of poly(3-hexyl thiophene) // Biosensors and Bioelectronics. — 2004. — V. 20, N3. — P. 651–657.
4. Svorec J., Miertus S., Barlikova A. Hybrid biosensor for the determination of lactose // Anal. Chem. — 1990. — V. 62, N15. — P. 1628–1631.
5. Filipiak M., Fludra K., Gosciminska E. Enzymatic membranes for determination of some disaccharides by means of oxygen electrode // Biosensors and Bioelectronics. — 1996. — V. 11, N4. — P. 355–364.
6. Mori T., Motonaga T., Okahata Y. Cast films of lipid-coated enzymes as selective sensors for disaccharides // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. — 1999. — V. 146, N1–3. — P. 387–395.
7. Rajendran V., Irudayaraj J. Detection of glucose, galactose, and lactose in milk with a microdialysis-coupled flow injection amperometric sensor // J. of Dairy Sci. — 2002. — V. 85, N6. — P. 1357–1361.
8. Eshkenazi E., Maltz B., Zion J., Rishpon. A three-cascaded-enzymes biosensor to determine lactose concentration in raw milk // Ibid. — 2000. — V. 83, N9. — P. 1939–1945.
9. Maestre E., Katakis I., Narvaez A., Dominguez E. A multianalyte flow electrochemical cell: application to the simultaneous determination of carbohydrates based on bioelectrocatalytic detection // Biosensors and Bioelectronics. — 2005. — V. 21, N5. — P. 774–781.
10. Kullick T., Bock U., Schubert J. et al. Electroanalytical chemistry and sensor // Anal. Chim. Acta. — 1995. — V. 300, N1–3. — P. 25–31.
11. Kullick T., Beyer M., Henning J. et al. Application of enzyme field-effect transistor sensor arrays as detectors in a flow-injection system for simultaneous monitoring of medium components. Part I. Preparation and calibration // Ibid. — 1994. — V. 296, N3. — P. 263–269.
12. Kullick T., Bock U., Schubert J. et al. Application of enzyme-field effect transistor sensor arrays as detectors in a flow-injection analysis system for simultaneous monitoring of medium components. Part II. Monitoring of cultivation processes // Ibid. — 1995. — V. 300, N1–3. — P. 25–31.
13. Stoica L., Ludwig R., Haltrich D., Gorton L. Third-Generation Biosensor for Lactose Based on Newly Discovered Cellobiose Dehydrogenase // Anal. Chem. — 2006. — V. 78, N2. — P. 393–398.
14. Tkac J., Sturdik E., Gemeiner P. Novel glucose non-interference biosensor for lactose detection based on galactose oxidase-peroxidase with and without co-immobilised β -galactosidase // Analyst. — 2000. — V. 125, N7. — P. 1285–1289.
15. Svitel J., Curilla O., Tkac J. Microbial cell-based biosensor for sensing glucose, sucrose or lactose // Biotechnol. Appl. Biochem. — 1998. — V. 27, N2. — P. 153–158.
16. Aoki K., Suzuki H., Ishimaru Y. et al. Thermophilic glucokinase-based sensors for the determination of various saccharides and glycosides // Sensors and Actuators B. — 2005. — V. 108, N1–2. — P. 727–732.
17. Дзядевич С. В., Солдаткін О. П. Кондуктометричний метод вимірювань в ферментному аналізі // Укр. біохім. журн. — 1994. — Т. 66, №4. — С. 30–42.
18. Дзядевич С. В. Кондуктометричні ферментні біосенсори: теорія, технологія, застосування // Біополімери і клітина. — 2005. — Т. 21, №2. — С. 91–106.
19. Дзядевич С. В., Шульга А. А., Пацковський С. В. і др. Тонкопленочний кондуктометричний датчик для ферментних біосенсорів // Електрохімія. — 1994. — Т. 30, №8. — С. 982–987.
20. Пешкова В. М., Солдаткін О. О., Дзядевич С. В. Оптимізація методики визначення сахарози в соках та солодких напоях кондуктометричним ферментним біосенсором // Біополімери і клітина. — 2007. — Т. 23, №6. — С. 501–510.

**ФЕРМЕНТНЫЙ
КОНДУКТОМЕТРИЧЕСКИЙ БИОСЕНСОР
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛАКТОЗЫ**

*В. Н. Пешкова^{1,2}
О. Я. Саяпина^{1,3}
А. А. Солдаткин¹
О. Л. Кукла⁴
С. В. Дзядевич¹*

¹Институт молекулярной биологии и генетики
НАН Украины, Киев

²Киевский национальный университет
имени Тараса Шевченко

³Национальный университет
пищевых технологий, Киев

⁴Институт физики полупроводников
им. В. Е. Лашкарева НАН Украины, Киев

E-mail: victoir@ukr.net

Разработан ферментный кондуктометрический биосенсор для определения лактозы. Биоселективным элементом является триферментная мембрана (глюкозооксидаза, мутаротаза, β -галактозидаза), иммобилизованная на поверхность кондуктометрического преобразователя. Исследованы рабочие характеристики полученного биосенсора. Время определения концентрации лактозы в растворе составляло 1–2 мин, линейный диапазон работы биосенсора — от 0,01 мМ до 0,75 мМ для глюкозы и от 0,01 мМ до 1,25 мМ для лактозы. Изучена зависимость величины отклика биосенсора на внесение субстрата от рН, ионной силы и буферной емкости рабочего раствора и представлены данные по селективности биосенсора и стабильности его при хранении. Созданный кондуктометрический биосенсор характеризуется высокой операционной стабильностью и воспроизводимостью сигнала.

Ключевые слова: кондуктометрический ферментный биосенсор, лактоза, глюкоза, глюкозооксидаза, мутаротаза, β -галактозидаза.

**ENZYME CONDUCTOMETRIC
BIOSENSOR FOR LACTOSE CONTENT
DETERMINATION**

*V. M. Pyeshkova^{1,2}
O. Y. Saiapina^{1,3}
O. O. Soldatkin¹
O. L. Kukla⁴
S. V. Dzyadevych¹*

¹Institute of Molecular Biology and Genetics of
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

²National Taras Shevchenko
University of Kyiv

³National Food Industry University, Kyiv

⁴Institute of Semiconductor Physics
of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: victoir@ukr.net

Enzyme conductometric biosensor for lactose determination has been developed. Three-enzyme membrane (glucose oxidase, mutarotase, β -galactosidase) immobilized on the surface of conductometric transducer was used as biosensitive element. The analytical characteristic of the biosensor obtained were investigated. The time of lactose analysis in solution was 1–2 minutes, linear range was from 0,01 mM to 0,75 mM for glucose determination and from 0,01 mM to 1,25 mM for lactose determination. Dependence of responses of biosensor to substrate on pH, ionic strength, buffer capacity of work solution were studied, and the data of selectivity and storage stability were presented. The developed conductometric biosensor is featured in high operational stability and signal reproducibility.

Key words: conductometric enzyme biosensor, lactose, glucose, glucose oxidase, mutarotase, β -galactosidase.

УДК 543.062 : 546.7 : 579.2

QUANTITATIVE ASSAY OF CHROMIUM(III) IN YEAST CULTURES USING CHROMAZUROL S AND SURFACTANTS FOR MONITORING CHROMATE REMEDIATION PROCESSES

*Honchar T. M.*¹*Ksheminska H. P.*¹*Patsay I. O.*²*Huta O. M.*²*Gonchar M. V.*¹¹Institute of Cell Biology of National Academy of Sciences
of Ukraine, Lviv²Ivan Franko National University of Lviv, Ukraine*E-mail: gonchar@cellbiol.lviv.ua*

Because microorganisms are regarded as a potential means for bioremediation of chromium compounds and the yeasts are considered to be the source of chromium pharmaceutical biocomplexes, the development of the methods for chromium assay in real biological samples is of a significant biotechnological importance. A new sensitive method for the photometric assay of total chromium in the form of Cr(III) in microbial cultures after their mineralization was developed using the reaction with chromazurol S in the presence of the surfactants, sodium dodecyl sulfate (SDS) or cetyltrimethylammonium bromide (CTMAB). The optimal values of chromazurol S and surfactants concentrations were determined to achieve the maximal sensitivity of the analysis. Molar extinction coefficients of the complexes in 0.2 M sulfuric acid were shown to equal 27 and 98.9 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ in cases of using SDS and CTMAB, respectively. The latter variant of chromium (III) assay is 3 times more sensitive than diphenylcarbazine method. The threshold sensitivity of chromazurol method is approximately 100 and 25 ng of chromium per 1 ml of the final reaction mixture for two variants of the assay in cases of using SDS and CTMAB, respectively. A convenient and relatively fast method for mineralization of the biological samples was optimized using perhydrol and sulfuric acid. It was shown that the developed methods can be used for the monitoring of chromate-reduction processes in yeast cultures by the final product Cr(III), as well as for determination of the total chromium content in microbial cultures or in the cells after their mineralization.

Key words: chromium(III), chromazurol S, sodium dodecylsulfate, cetyltrimethylammonium bromide, photometric assay, yeast culture.

In different biological systems, chromium can be represented both as a necessary microelement (Cr^{+3}) and a dangerous environmental pollutant (especially in the forms of chromates/bichromates — Cr^{+6}). Trivalent chromium (in the amounts of 50–200 μg per day) is necessary for normal vital activity of animals and people due to the role it plays in metabolism of glucose, cholesterol, and fats [1–3]. This microelement is a significant component of glucose tolerance factor, which, synergically with insulin, activates glucose consumption [4]. Chromium can also take part in regulation of gene expression as zinc mimetic. Cr (III) complexes have already become an integral part of pharmaceutical practice as the factors preventing diabetes and stimulating weight loss. On the other hand, the wide industrial use of chromium compounds results in accumulation of chromium in waste waters, soil, and plants, which leads to chronic or sometimes acute intoxication of human organism. The facts mentioned above

testify to a great need for selective, sensitive, and, at the same time, non-expensive methods of chromium analysis in biological samples, including those for control of diabetes type II treatment [5, 6]. Applied microbiology is considered to be the important area in chromium analysis, as microorganisms are regarded as potential means for bioremediation of chromium compounds [7], and the yeasts are considered to be the source of chromium biocomplexes, which may be of pharmaceutical significance [8, 9].

Nowadays there are various chemical and physico-chemical methods of chromium content determination, namely, gravimetric methods, titrimetric methods (redox, chelatometric, potentiometric, amperometric, coulometric titration), photometric methods (based on light-absorption of Cr(VI) and Cr(III) ions as well as of their compounds with inorganic and organic reagents), luminescent, polarographic, kinetic (oxidative reaction by hydrogen peroxide, potassium bromate), methods of isotopic

процедуру (схему) одержання морфогенних калюсних тканин наведено на рис. 2.

За цією схемою одержали велику кількість регенерантів, які можна мультиплікувати так само, як і описані вище рослини, отримані прямою регенерацією. Одержані регенеранти досліджуються методами ПЛР-аналізу для вивчення можливих генетичних відмінностей їх від вихідних цибулин.

Таким чином, для рідкісної лікарської рослини унгернії Віктора уперше розроблено умови мікроклонального розмноження як прямою регенерацією із фрагментів луксок різних цибулин, так й індукуванням регенерації із пасивованих тривалий час калюсних тканин у культурі *in vitro*. Встановлено, що оптимальним середовищем як для індукування регенерації, так і для отримання та вирощування у пересадній культурі калюсних культур є живильне середовище

з мінеральною основою за Воллосовичем та ін. Підібрано оптимальні співвідношення стимуляторів росту, зокрема ауксинів і цитокинінів, для кожного з вивчених процесів — прямої регенерації, індукції калюсоутворення, тривалого вирощування калюсних тканин зі збереженням морфогенного потенціалу, індукції редиференціації, мультиплікації і вирощування регенерантів *in vitro*. Виявлено, що освітлення пригнічує утворення регенерантів і калюсоутворення на первинних експлантах, а також гальмує процеси регенерації мікроцибулинок пасивованими калюсними тканинами та ріст калюсних тканин. Встановлено відмінності реакції різних цибулин унгернії Віктора на ті самі умови введення в культуру *in vitro*, що, очевидно, зумовлено відмінностями генотипів використаних цибулин, виявленими раніше методом RAPD ПЛР-аналізу.

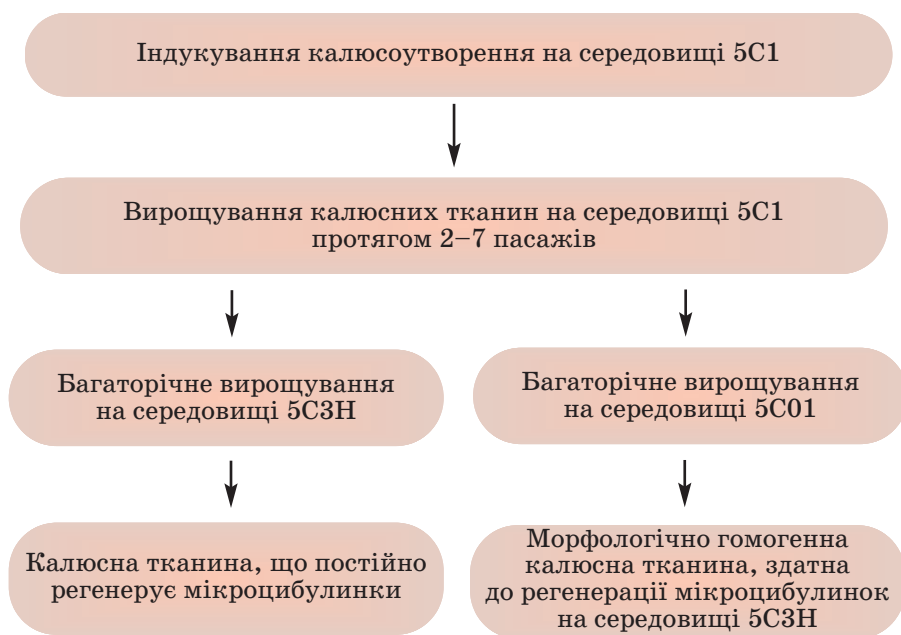


Рис. 2. Схема одержання морфогенних калюсних тканин *U. victoris*, здатних до регенерації протягом не менше 6 років (склад живильних середовищ — табл. 1)

dilution, gas-chromatographic methods, magnetic relaxation analysis, emission flame photometry, atomic absorption spectrometry, atomic fluorescence flame spectrometry, X-ray-fluorescence analysis, mass spectrometric analysis, radioactive and neutron activation analysis, *etc.* [10, 11]. Recently, potentiometric chemical sensors based on ion-selective electrodes for Cr (III) [12–14] and chromate [15, 16] analysis as well as amperometric chromate-selective biosensor based on bacterial cytochrome c_3 [17] have been developed. Photometric method of Cr (III) content determination through the reaction with chromazurol S has been described [18, 19].

The vast majority of methods of chromium analysis are designed for inorganic objects (industrial waters, alloys, minerals) and only a few of them are designed for biological samples. Spectrophotometry and atomic absorption spectrophotometry [10, 20, 21] can be singled out among the most commonly used methods of Cr analysis in biological material, however, the latter does not allow determining different Cr valency forms. Cr(VI) (chromate) is determined photometrically using diphenylcarbazide [22, 23], which may also be used for determination of total Cr content after Cr(III) oxidation to chromate by permanganate or other oxidants [10]. Regardless of a wide use of diphenylcarbazide method, it is worth mentioning that this method is sensitive to negative influence of various oxidants, *e.g.* Fe(III), Hg(II), molybdate, and vanadate ions.

The photometric method of determining Cr(III) using the reaction with chromazurol S is described [18, 19]. The development of a new and more sensitive variant of chromazurol method for Cr(III) determination using different surfactants, as well as the approbation of the optimized method for the analysis of biological samples, in particular yeast determination of Cr(III) content in microbial yeast cultures in the process of chromate reduction were set to be the aims of our work. The research resulted in development of the sensitive photometric method for total Cr(III) content determination in mineralized biological samples, which can be of wide practical application.

Materials and Methods

Chemicals

All chemicals used, *i.e.* chromazurol S (China), cetyltrimethylammonium bromide (*Chemapol*, the Czech Republic), sodium dodecyl sulfate (*Sigma*), diphenylcarbazide, perhydrol (33%) as well as all other chemicals were ana-

lytical reagent grade or better. The water used was subdued to three-stage purification using DEMIWA 10 roi equipment.

Yeast strains

Histidine-dependent strain of *P. guilliermondii* ATCC90191 (L2) was used.

Cultivation

The yeast cells were cultivated at 30 °C in Erlenmeyer's flasks on a circular shaker (200 rpm) in Burkholder's medium [24] of the following composition: saccharose (2%), yeast extract (0.1%), and histidine (40 mg/l). Sterile chromate solution (K_2CrO_4) in the concentration of 1.5 μ moles/ml (1.5 mM) was added at the log phase of growth at the cell concentration of 0.3 mg/ml. Yeast biomass was determined turbidimetrically using photocolimeter FEC-56M ($\lambda_{max} = 540$ nm). Dry mass (mg/ml) was calculated by gravimetrically obtained calibration curve.

Mineralization of yeast culture samples

Using the mixture of nitric and sulfuric acids

The samples of 0.5–1 ml in thermostable test tubes were placed in an aluminum block, evaporated, treated with 0.25 ml mixture of H_2SO_4 and HNO_3 (1:2.5) and heated at 240 °C till complete burning and nitroso-sulfuric acid removal [25]. The residues were neutralized by adding 0.1–0.12 ml 10 M NaOH, 0.2 ml 1 M acetate buffer (pH 5.0), and subacid pH level was achieved by adding 1 M NaOH, when needed.

Using nitric acid and hydrobromic acids, HBr and $KBrO_3$ mixture (performed in accordance with [26])

Using perhydrol in acid medium (optimal variant)

The samples of 0.02–0.5 ml in thermostable test tubes were heated in aluminum block at 120 °C and evaporated until they were almost dried. After adding 0.2 ml of sulfuric acid (1:3), the samples were heated at 120 °C till slight carbonization of the biomass. After water evaporation, 0.4 ml of perhydrol was added, and the samples were heated again to complete removal of vapors and clearing. The treatment of samples by perhydrol was repeated, if needed (in the case when cell biomass exceeds 3 mg, brown coloring of under-burned products may appear after one time perhydrol treatment), gradually increasing the temperature to 170 °C. Finally, 0.2 ml of water were added and the mixture was evaporated until only sulfuric acid remained and blue coloring of Cr(III) appeared. After cooling, 1 ml of water was added to the mixture, neutralized to subacid reaction by adding 0.5 ml 1 M NaOH and 0.5 ml 1 M acetate buffer (pH 3.5) (avoiding alkalizing of the samples). Volume of the mixture was adjusted to 5 ml by adding water.

Cr(III) model biocomplex formation

The mixture was prepared in the molar ratio of 1:2 [Cr(III):reduced glutathione], sustained at room temperature for 24 hours. Quantitative formation of the complex was approved by spectrophotometer at extinction maxima of 410 and 565 nm.

Development of photometric method of Cr(III) determination was performed as described below in **Results and Discussion**. Herein, the description of final (optimized) analysis procedures using two surfactants [sodium dodecyl sulfate (SDS) and cetyltrimethylammonium bromide (CTMAB)] is presented. 10 mM Cr(III) solution, obtained by dissolving of a definite aliquot of metallic chromium in 1 M sulfuric acid, was used as the standard. The analyte solutions were prepared by dissolving the initial chromium solution with 10 mM sulfuric acid or 10 mM acetate buffer, pH 3.5, to the final concentration of 0.05 mM.

The method with the use of SDS

Using 5 ml graduated test tubes, 1 ml 1% SDS, 0.5 ml 1M acetate buffer (pH 3.5), 0.5 ml 0.06% chromazurol S, 0.1–0.5 ml of the analyzed sample were mixed, and the volume was adjusted to 4 ml by distilled water. The samples were placed in boiling water bath for 30 min. After cooling, 1 ml 1 M sulfuric acid was added, and the final volume was adjusted to 5 ml by water, if needed. The mixtures were photometrically tested in 1 cm cuvettes using photocolormeter KFK-2MP (with $\lambda_{\max} = 590$ nm) or spectrophotometer ($\lambda_{\max} = 610$ nm). The «blank» sample (all components but chromium) and standard Cr(III) solutions in two concentrations were treated by the same way. Cr(III) concentration was calculated on the base of optic density for the standard or using calibration curve.

In model investigations (see Fig. 1), the solutions without sulfuric acid (final component concentrations were 1.25 times higher than those in the finally selected variant of analysis with acid) were also photometrically analyzed.

The method with the use of CTMAB

Using 5 ml graduated test tubes, there were mixed 0.2 ml 0.4% CTMAB, 1 ml 0.5 M acetate buffer (pH 3.5), 1 ml 0.03% chromazurol S, 0.1–0.5 ml of the analyzed sample, and the volume was adjusted to 4 ml by distilled water. The samples were placed in boiling water bath for 40 min. After cooling, 1 ml 1 M sulfuric acid was added, and then water to the final volume of 5 ml, if needed. The solutions were photometrically tested in 1 cm

cuvettes using KFK-2MP (with $\lambda_{\max} = 590$ nm) or spectrophotometer ($\lambda_{\max} = 610$ nm). The «blank» sample (all components but chromium) and standard Cr(III) solutions in two concentrations were treated by the same way. Cr(III) concentration was calculated on the base of optic density for standard or using calibration curve.

Statistical and regression analyses of calibration curves were performed using Microcal Origin 6.0 software.

Results and Discussion

The formation of colored Cr(III) complexes with chromazurol S [18] and photometric method for the metal assay using different activation means for Cr(III) are described in literature [19]. Molar extinction coefficients of Cr(III) complexes with chromazurol S in subacid medium (pH 3.0–5.0) are 59 and 71 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (the former is for reagent surplus and the latter — for metal ions surplus) [18], which is almost two times higher than the similar coefficient for chromate assay by the diphenylcarbazide method ($33 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) [27]. On the other hand, a number of transition metal ions are known to form triple complexes with organic dyes and surfactants with high values of molar extinction, for example, in the case of Cu(II)-chromazurol S-surfactant complexes [28]. Our goal was to develop selective and highly sensitive variant of photometric determination of Cr(III) using chromazurol S and various surfactants of anionic (sodium dodecyl sulfate, SDS) and cationic (cetyltrimethylammonium bromide, CTMAB) nature.

50 mM acetate buffer (pH 3.5) was selected as the working buffer. At higher pH values (4.5–5.5) chromazurol S complex with Fe(III), which is often present in biological samples, can be formed. On the other hand, at pH < 3.0 the rate of Cr(III) interaction with the reagent decreases significantly.

The improvement of the assay method consisted in the study of optimal concentrations of chromazurol S and surfactant, as well as of optimizing conditions for photometry of the final reaction mixture – without changing pH or after its preliminary acidification by sulfuric acid. Extinction spectra were obtained using Shimadzu UV-1650 PC spectrophotometer. Optical density of the solutions was measured using photocolormeter KFK-2MP or spectrophotometer SF-46.

Optimization of SDS-chromazurol method

Experiments revealed that for Cr(III) assay by SDS-method, the optimal concentration of

chromazurol S (recalculated for final photometric solution after sulfuric acid addition) equals 0.006% and SDS — 0.2%. Acidification of the reaction mixture with sulfuric acid (to 0.2 M) before the photometry is reasonable due to the three following reasons: 1) the background extinction (optical density for the «blank» sample) in supraacid medium is three times lower when compared to subacid medium (pH 3.5); 2) higher stability of optical densities of the solutions; 3) higher assay selectivity as a result of Fe(III)-chromazurol S complex destruction in supraacid medium, which is significant for avoiding its interfering influence on chromium assay. Maximal extinction of the complex is observed in 0.2 mM sulfuric acid at 590–610 nm. Sensitivity of the method is enhanced significantly with increasing chromazurol S concentration in the range from 0.003 to 0.006% (2.4 times), and in a lesser extent — when chromazurol S concentration is increased to 0.01% (only by 5.7% compared to the concentration of 0.006%). The optimal concentration of SDS, in terms of the best sensitivity, is in the range of 0.1–0.4% (Fig. 1). The molar extinction of the formed complex equals to $27.0 \pm 0.75 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ at optimal reaction conditions (supraacid medium), which is close to the similar coefficient for the diphenylcarbazide method. Although the proposed variant of analysis is inferior in sensitivity, compared to photometry in subacid medium, it is not sensitive to interfering influence of Fe(III) ions, as Fe(III) complex with chromazurol S is dissociated in supraacid medium. Our experiments confirmed the absence of reaction between chromazurol S

and model solutions of Fe ions in two valence states at the final concentrations in photometric solution from 0.001 to 0.1 mM (Fe^{3+}) and 0.001 to 0.1 mM (Fe^{2+}).

Figure 2 presents the calibration curve for determination of Cr(III) content using SDS-chromazurol method at the optimized conditions. Linear dependency between optical density and Cr concentration is observed: linear regression coefficient $R = 0.999$; $p < 0.0001$. The threshold of Cr(III) assay by this method is around 20 μM or 1.0 $\mu\text{g/ml}$ (recalculation was made for initial (analyzed) sample at the relation of 0.5 ml sample per 5 ml of photometric solution).

Optimization of CTMAB-chromazurol method

To develop the other variant of Cr(III) determination using CTMAB, optimal reaction conditions have been defined, namely, concentrations of components, optical wavelength, and the influence of acidification of the reaction mixture. Spectral measurements (spectra are not presented) showed that maximal extinction for reagent (without Cr adding) was observed at 501 nm (pH 3.5) and 464 nm (0.2 M H_2SO_4). Extinction peak for Cr(III)-chromazurol S complex in the presence of CTMAB is shifted to the area of 580–610 nm at two mentioned above acidity parameters. As in supraacid medium (0.2 M H_2SO_4) extinction maxima for reagent and colored product are more distant on the scale of wavelengths (better reaction contrast), supraacid conditions (adding sulfuric acid up to 0.2 M), and the wavelength for photometry of 610 nm (spectrophotometer) and 590 nm (photoco-

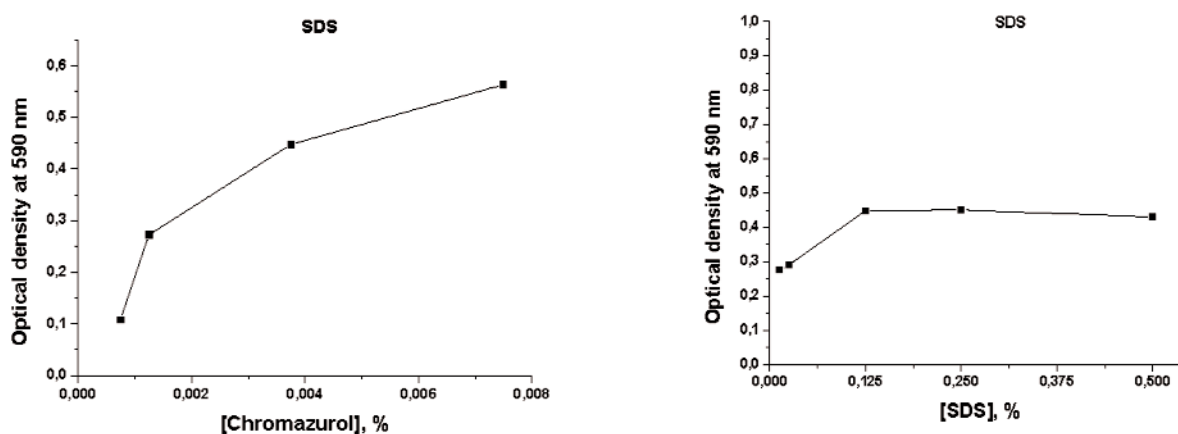


Fig. 1. Optimization of chromazurol S (left) and SDS (right) concentrations in the reaction mixture for the assay of Cr(III) using SDS-chromazurol method (the data concern the reaction with no acidification of the reaction mixture using sulfuric acid).

Reaction conditions: left chart: $[\text{SDS}] = 0.25\%$; right chart — $[\text{chromazurol S}] = 0.00375\%$. Optical density values of the samples (with 0.01 mM Cr(III)) were measured in 1 cm cuvettes at 590 nm using KFK-2M photocolorimeter vs «blank» sample (with no Cr)

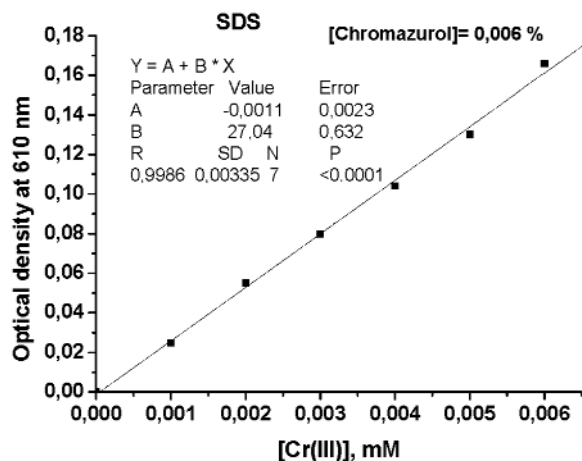


Fig. 2. Calibration curve diagram for Cr(III) determination using SDS-chromazurol method at chromazurol S concentration in the reaction mixture 0.006%, and SDS — 0.2%. Y-axis — optical density, after acidification with sulfuric acid (0.2 M), X-axis — final Cr concentration in photometric mixture

lorimeter KFK-2MP) were selected for the assay. Though molar extinction of Cr complex is 1.5 times lower at supraacid conditions (Fig. 3), this variant was selected as the reasonable one due to a lower background signal as well (optical density for the «blank» sample).

Experiments for optimization of CTMAB-chromazurol assay method showed that optimal concentration of chromazurol S (recalculated for the final photometric solution in the presence of sulfuric acid) was 0.006%, and CTMAB — 0.016%. The sensitivity of the method is linearly dependent on chromazurol S concentration in the range from 0.0005 to 0.003% (Fig. 4). Further increase of chromazurol S concentration up to 0.006% results in enhanced assay sensitivity, however, this positive effect is accompanied by undesirable increase of optical density for the «blank» sample. The influence of CTMAB surfactant concentration on the formation of the complex was shown to be more complicated, than in case with SDS: initially, the positive influence of CTMAB is observed (to the concentration of 0.01–0.015%), which was changed by gradual decrease of optical density (higher than 0.2% CTMAB). It is noteworthy that optimal CTMAB concentration in molar presentation (about 0.4 mM) is more than 16 times lower than the optimal SDS concentration (about 7 mM) at the same molar concentration of chromazurol S being around 0.1 mM (Fig. 5). These results allow to suggest trivalent complex formation in the system of Cr(III)-chromazurol S-CTMAB, similar to the described complex for Cu(II) ions [28].

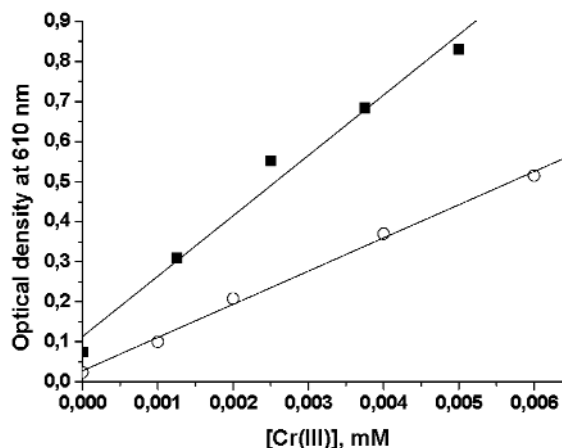


Fig. 3. The dependence of optical density of the reaction mixture at 610 nm on final Cr(III) concentration: without acid (top curve, ■) and with acid (bottom curve, ○). Chromazurol S concentration — 0.003 and 0.00375 %, and CTMAB — 0.016 and 0.02 % for variants with and without acid, respectively

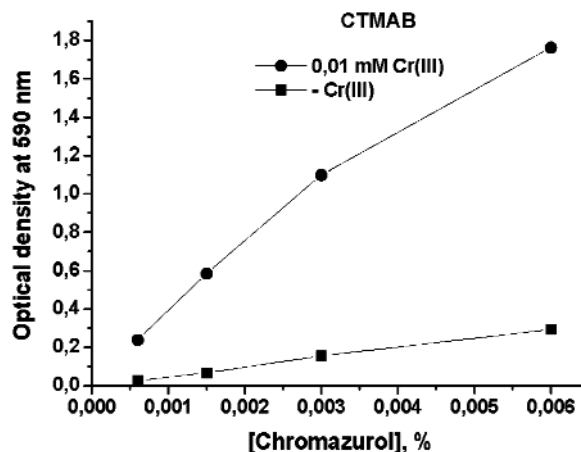


Fig. 4. Influence of chromazurol S concentration in the reaction mixture on sensitivity of Cr(III) determination using CTMAB-chromazurol method. Surfactant concentration — 0.016 %. Top curve (●) corresponds to optical density of samples at Cr concentration 0.01 mM, and the bottom one (■) — optical density of «blank» samples (with no Cr). Photometry was performed with no sulfuric acid addition

Molar extinction coefficient for Cr(III)-CTMAB-chromazurol S complex in 0.2 M H_2SO_4 at the optimal reaction conditions (0.006% chromazurol S and 0.016% CTMAB) at $\lambda = 610$ nm is $98.9 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, which exceeds the corresponding coefficient for the colored product for SDS-chromazurol method more than 4 times, and it exceeds the coefficient for diphenylcarbazide method more than 3 times. The threshold for Cr(III) determination using CTMAB-chromazurol method was around $5 \mu\text{M}$ or $0.25 \mu\text{g/ml}$ (recalculating for the initial

(analyzed) sample in the ratio of 0.5 ml of the sample per 5 ml of photometric solution). In subacid solution (pH 3.5) this complex has a higher molar extinction (up to $148 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), which allows achieving the maximal sensitivity of the photometric method, however, from the standpoint of complex stability and selectivity, the determination is more reasonable to be performed by photometric measuring in $0.2 \text{ M H}_2\text{SO}_4$. Absorbance of supraacid solutions remains stable for at least 2 hours.

The study on the influence of boiling duration on colored complex formation revealed the optimal time for quantitative reaction to be 30 min for SDS-variant and 40 min — for CTMAB-method (Table 1).

Table 1. Influence of boiling time on apparent values of molar extinction ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) for Cr(III) assay by chromazurol method in the presence of SDS and CTMAB in acid solution ($0.2 \text{ M H}_2\text{SO}_4$).

Variant	Boiling time, min					
	10	20	30	40	50	60
SDS	18.0 ± 1.5	22.9 ± 1.3	26.2 ± 1.9	27.9 ± 0.95	28.0 ± 0.81	–
CTMAB	–	65.9 ± 2.5	83.6 ± 6.0	95.5 ± 8.2	–	90.9 ± 2.6

Both SDS-variant and CTMAB-method are insensitive to negative influence of Fe ions, as the formation of colored complex of chromazurol S with model solutions of Fe ions at the final concentration of 0.001 to 0.1 mM (Fe^{3+}) and from 0.01 to 1 mM (Fe^{2+}) in the mixture was not observed (data not shown).

As the developed methods of photometric determination of Cr(III) belong to ultramicromethods (esp. CTMAB-variant), in order to avoid possible errors due to different quality of water, chemicals, etc. it is recommended to set Cr(III) standard in each series of analytical assays for its correlation with the calibration curve (Fig. 6). It is also recommended to apply the test «added-determined» occasionally for the biological sample mineralization to control a completeness of this process (see next chapter).

Validation of the developed methods for Cr(III) determination on model samples and real biological objects

The reliability of both variants of Cr(III) analyses was tested using Cr(III) model bio-complex with reduced glutathione and real yeast culture samples cultivated in the presence of chromate, which were shown to reduce Cr(VI) to Cr(III)-containing complexes [8]. Besides, there were used the culture samples with additionally added chromate, Cr(III) or

their mixtures after cultivation completion. The samples were exposed to acid oxidative mineralization before determining Cr(III) content. Since the search for mineralization methods in the literature did not reveal unambiguous results on which variant is the best for Cr content determination, we validated 4 most commonly used approaches of burning and mineralization of biological samples: 1) thermal treatment by the mixture of sulfuric and nitric acids; 2) burning in nitric acid with further treatment of samples with hydrobromic acid; 3) oxidation using $\text{HBr} + \text{KBrO}_3$ mixture; 4) oxidation by perhydrol in acidic medium. The following criteria were used to select the optimal mineralization method, namely, the completeness of biological material oxidation, the transfer of all Cr forms into Cr(III) mineral salts, operational processability (temperature and time mode, convenience of the subsequent operation of achieving the needed pH level of samples), and, of course, the reliability of discoveries of all Cr forms as Cr(III). It was shown that the mineralization conditions significantly influence on the reliability of Cr determination in biological samples. The experiments performed resulted in development of the optimal mineralization procedure with the use of perhydrol in the presence of middle concentration of sulfuric acid. The commonly used mineralization method by using the mixture of sulfuric and nitric acids was revealed to be inconvenient to perform due to the use of concentrated acids and high burning temperatures ($200\text{--}220 \text{ }^\circ\text{C}$ for oxidation of organic material, and $\sim 300 \text{ }^\circ\text{C}$ for nitrosulfuric acid destruction, which prevents determining Cr), time of the operation (more than 2 hrs), the necessity for individual neutralization mode of certain samples after burning, due to different pH levels. Other less commonly used mineralization methods: i) using nitric and hydrobromic acid (the former for burning the sample and the latter for removing HNO_3 surplus); the mixtures of $\text{HBr} + \text{KBrO}_3$, which generates free Br_2 as the oxidant [26], require less strict conditions, however, the complete oxidation is achieved at significant reagent amounts, which makes it impossible to perform serial burning of multiple samples in regular test tubes placed in aluminum block. The use of perchloric acid as an oxidizing agent component is inconvenient due to the risk of explosion [26]. Our experience showed that the most suitable method of oxidative mineralization of biological material for Cr determination is the method which involves perhydrol (concentrated hydrogen

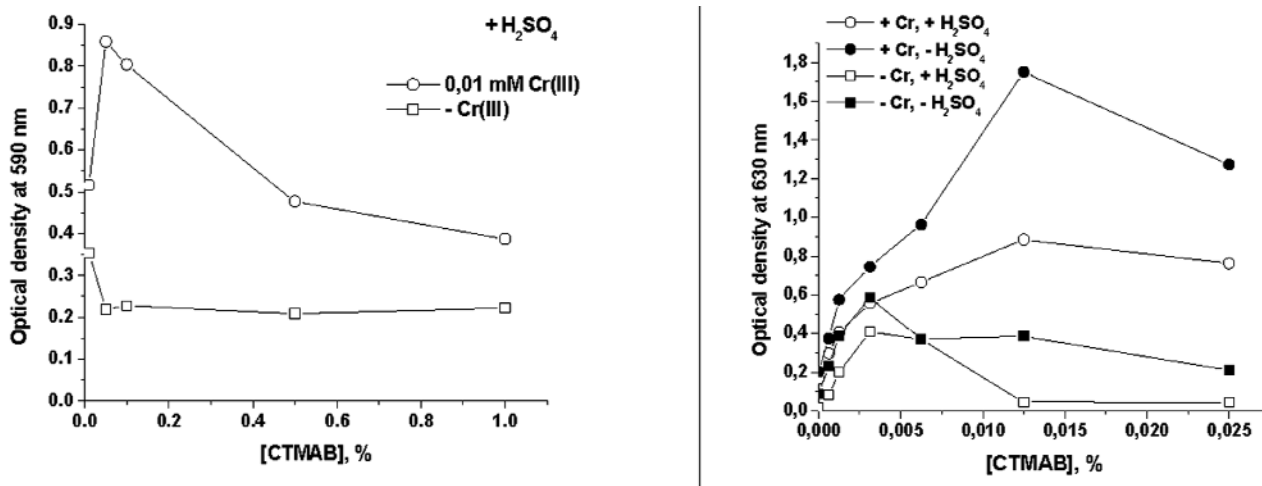


Fig. 5. CTMAB influence in different concentration ranges on colored product formation for Cr(III) assay using chromazurol method. The data are presented for both variants of the reaction mixture: acidified («+H₂SO₄»: O, □) and without sulfuric acid addition («-H₂SO₄»: ●, ■).

Reaction conditions: chromazurol S concentration — 0.00375 % (without acid) and 0.003% (with acid). Cr(III) concentration in samples (●, O) — 0.01 mM. «Blank» samples (■, □) did not contain Cr

peroxide solution) used in the presence of sulfuric acid. The procedure lasts about 2 hours, at relatively high temperature (120–170 °C), the oxidizing reagent does not create any by-products, which would interfere with Cr determination, and the concentration of residual acid does not vary significantly after burning (thermal decomposition does not take place, which makes more easy to perform the neutralization procedure to the necessary pH level).

Total Cr analysis in model mineralized samples using the chromazurol method in two

variants showed a good correlation of Cr content values with the expected ones for different types of samples: chromate water solution, Cr(III), and their mixtures; cultures cultivated in the presence of chromate, and those with additional introduction of Cr in the two valence states directly before culture mineralization; Cr(III) complex with glutathione (Table 2). In the majority of the samples the level of Cr detecting was higher than 90–95%.

Thus, a novel sensitive method for photometric determination of total chromium

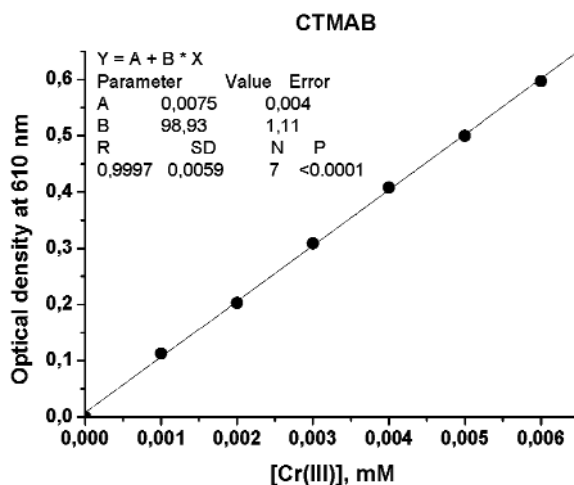


Fig. 6. Calibration curve for Cr(III) determination using CTMAB-chromazurol method at chromazurol concentration of 0.006%, and CTMAB — 0.016% in the reaction mixture.

Y-axis — optical density of mixtures, acidified by sulfuric acid (0.2 M),

X-axis — final Cr concentration in photometric mixture. Optical densities of the samples were measured vs. «blank» sample

Table 2. Validity of determination of total Cr(III) in the mineralized samples by SDS-chromazurol method (results for CTMAB-method are presented in brackets) using a test «added-determined»

№	Sample	Cr added, μmoles				Cr determined, μmoles $M \pm m$	Deviation from expected, %
		In a medium	Additionally before mineralization				
			Cr(III)	Cr(VI)	Total		
1	Yeast culture (0.5 ml; 2.8 mg of cells) after reduction of 1.5 mM of chromate	0.75			0.75	0.615 ± 0.031 (0.589 ± 0.040)	-18.0 (-21.5)
2	The same; Cr(III) added	0.75	0.5	–	1.25	1.15 ± 0.051 (1.057 ± 0.028)	-8.0 (-15.4)
3	The same; Cr(VI) added	0.75	–	0.5	1.25	1.11 ± 0.055 (1.177 ± 0.030)	-11.2 (-5.8)
4	The same; Cr(III) and Cr(VI) added	0.75	0.25	0.25	1.25	1.22 ± 0.108 (1.014 ± 0.044)	-2.4 (-18.9)
5	Water, Cr added	–	1.25	–	1.25	1.22 ± 0.044 (1.27 ± 0.050)	-2.4 (+1.6)
6	Water, Cr added	–	–	1.25	1.25	1.20 ± 0.102 (1.254 ± 0.062)	-4.0 (+0.3)
7	Water, Cr added	–	0.625	0.625	1.25	1.33 ± 0.062 (1.39 ± 0.075)	+6.4 (+11.2)
8	Cr(III)-Glut complex	1.0	–	–	1.0	0.97 ± 0.070 (1.04 ± 0.043)	-3.0 (+4.0)

Abbreviation: Glut — reduced glutathione.

content in microbial cultures after acidative-oxidative mineralization using reaction with chromazurol S in the presence of two surfactants – sodium dodecyl sulfate (SDS) and cetyltrimethylammonium bromide (CTMAB) has been developed. The latter variant of the method developed is 3 times more sensitive compared to diphenylcarbazide method. Both variants of chromazurol method are simpler in terms of performance and do not require any tedious procedure of transforming all Cr forms to chromate after mineralization of the sample. Threshold sensitivity of chromazurol

method is around 100 and 25 ng of chromium in 1 ml of photometric samples for two variants of analysis using SDS and CTMAB, respectively. SDS variant is less sensitive, but this variant is more reproducible. A convenient and relatively fast method of mineralization of biological samples using perhydrol in the presence of sulfuric acid is optimized. The reliability of chromazurol method for total chromium content determination in real biological samples after mineralization is presented.

LITERATURE

1. Davis C. M., Vincent J. B. Chromium in carbohydrate and lipid metabolism // *J. Biol. Inorg. Chem.* — 1997. — V. 2. — P. 675–679.
2. Cefalu W. T., Hu F. B. Role of chromium in human health and in diabetes // *Diabetes Care.* — 2004. — V. 27, N11. — P. 2741–2751.
3. Vincent J. The biochemistry of chromium // *J. Nutr.* — 2000. — V. 130. — P. 715–718.
4. Vincent J. B. Mechanisms of chromium action: low-molecular-weight chromium-binding

substance // *J. Am. Col. Nutr.* — 1999. — V. 18, N1. — P. 6–12.

5. Morris B. W., MacNeil S., Hardisty C. A., Heller S., Burgin C., Gray T. A. Chromium homeostasis in patients with type II (NIDDM) diabetes // *J. Trace Elem. Med. Biol.* — 1999. — V. 13. — P. 57–61.

6. Vincent J. B. Quest for the molecular mechanism of chromium action and its relationship to diabetes // *Nutr. Rev.* — 2000. — V. 58. — P. 67–72.

7. Chen J. M., Hao O. J. Microbial chromium(VI) reduction // *Crit. Rev. Environ. Sc. Technol.* — 1998. — V. 28, N3. — P. 219–251.

8. *Ksheminska H. P., Honchar T. M., Gayda G. Z., Gonchar M. V.* Extra-cellular chromate-reducing activity of the yeast cultures // *Centr. Eur. J. Biol.* — 2006. — V. 1, N1. — P. 137–149.
9. *Honchar T. M., Zakal'ska O. M., Usatenko Yu. M.* Characterization of Cr(III)-biocomplexes formed during chromate reduction by the yeast cells *Pichia guilliermondii* // Abstracts of IX Ukrainian Biochemical Congress (24–27 October, 2006, Kharkiv). — 2006. — V. 1. — P. 116 (in Ukrainian).
10. *Lavrukhina A. K., Yukina L. V.* Analytical Chemistry of Chromium. — M.: Nauka, 1979. — 219 p. (in Russian).
11. *Chromium.* Analytical methods // www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp7-c6.pdf.
12. *Ganjali M. R., Mizani F., Salavati-Niasari M., Javanbakht M.* Novel potentiometric membrane sensor for the determination of trace amounts of chromium(III) ions // *Anal. Sc.* — 2003. — V. 19. — P. 235–238.
13. *Abbaspour A., Izadyar A.* Carbon nanotube composite coated platinum electrode for detection of Cr(III) in real samples // *Talanta.* — 2007. — V. 71, N2. — P. 887–892.
14. *Singh A. K., Gupta V. K., Gupta B.* Chromium(III) selective membrane sensors based on Schiff bases as chelating ionophores // *Anal. Chim. Acta.* — 2007. — V. 585, N1. — P. 171–178.
15. *Hassan S. S. M., Abbas M. N., Moustafa G. A. E.* Hydrogen chromate PVC matrix membrane sensor for potentiometric determination of chromium(III) and chromium(VI) ions // *Talanta.* — 1996. — V. 43. — P. 797–804.
16. *Singh L. P., Bhatnagar J. M., Tanaka S., Tsue H., Mori M.* Selective anion recognition: Charged diaza crown ethers based electrochemical sensors for chromate ions // *Anal. Chim. Acta.* — 2005. — V. 546, N2. — P. 199–205.
17. *Michel C., Battaglia-Brunet F., Minh C. T. et al.* Amperometric cytochrome c_3 -based biosensor for chromate determination // *Biosens. Bioelectron.* — 2003. — V. 19, N4. — P. 345–352.
18. *Pantaler R. P., Pulyaeva I. V.* A spectrophotometric study of complexation between chromium and chromazurol S // *Zhurn. Anal. Khim.* — 1985. — V. 40, N9. — P. 1634–1639 (in Russian).
19. *Morosanova E. I., Kozlov M. A., Kuz'min N. M.* Continuous flow analysis: photometric determination of Cr(III) with chrome azurol S using microwave treatment // *J. Anal. Chem.* — 2000. — V. 55, N2. — P. 182–187.
20. *Fishbein L.* Overview of analysis of carcinogenic and/or mutagenic metals in biological and environmental samples. I. Arsenic, beryllium, cadmium, chromium and selenium // *Int. J. Environ. Anal. Chem.* — 1984. — V. 17, N2. — P. 113–170.
21. *Sola-Larranaga C., Navarro-Blasco I.* Chromium content in different kinds of Spanish infant formulae and estimation of dietary intake by infants fed on reconstituted powder formulae // *Food Addit. Contam.* — 2006. — V. 23, N11. — P. 1157–1168.
22. *Marchart H.* Über die Reaktion von Chrom mit Diphenylcarbazid und Diphenylcarbazon // *Anal. Chim. Acta.* — 1964. — Vol. 30. — P. 11–17.
23. *Greenberg A. E., Connors J. J., Jenkins D., Franson M. A.* Standard methods for the examination of water and wastewater. — Washington: American Public Health Association, 1981 (15th ed.) — P.187–190.
24. *Burkholder P. R., McVeigh J., Moger D.* Studies on some growth factors on yeasts // *J. Bacteriol.* — 1944. — V. 48. — P. 385–391.
25. *Sendal E.* Colorimetric methods of metals' traces assay. — M.: Mir, 1964. — 489 p. (in Russian).
26. *D'Ulivo A., Lampugnani L.* Studies on total selenium determination in biological samples by hydride generation non-dispersive atomic fluorescence spectrometry after hydrobromic acid/bromine wet digestion // *Spectrochim. Acta.* — 1993. — V. 48B, N3. — P. 387–396.
27. *Egorov O., Ruzicka J.* Flow injection renewable fibre optic sensor system. Principle and validation on spectrophotometry of chromium(VI) // *The Analyst.* — 1995. — V. 120, N7. — P. 1959–1962.
28. *Nemcova I., Tomankova V., Rychlovsky P.* Non-extraction batchwise and FIA determination of cationic and nonionic surfactants using Cu(II)-chromazurol S-surfactant complexes // *Talanta.* — 2000. — V. 52. — P. 111–121.

**ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ХРОМУ(III)
У ДРІЖДЖОВИХ КУЛЬТУРАХ
ЗА ДОПОМОГОЮ ХРОМАЗУРОЛУ S
ТА ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН
ДЛЯ СКРИНІНГУ ПРОЦЕСІВ
БІОРЕМЕДІАЦІЇ ХРОМАТУ**

*Т. М. Гончар¹, Г. П. Кшемінська¹,
І. О. Пацай², О. М. Гута²,
М. В. Гончар¹*

¹Інститут біології клітини НАН України,
м. Львів

²Львівський національний університет
ім. Івана Франка, м. Львів

E-mail: gonchar@cellbiol.lviv.ua

Оскільки мікроорганізми розглядаються як потенційний засіб для біоремедіації сполук хрому, а дріжджі — як джерело біокомплексів хрому фармацевтичного значення, актуальною біотехнологічною проблемою є розробка методів визначення вмісту хрому в реальних зразках біологічного походження. Розроблено новий чутливий метод фотометричного визначення сумарного хрому у формі Cr(III) в мікробних культурах після їх мінералізації з використанням реакції з хромазуолом S у присутності поверхнево-активних речовин (ПАР) — додецилсульфату натрію (SDS) або цетилтриметиламмонійброміду (СТМАВ). Визначено оптимальні величини концентрації хромазуолу S і ПАР для досягнення максимальної чутливості аналізу. Показано, що молярні коефіцієнти екстинкції комплексів в 0,2 М сірчаній кислоті дорівнюють 27,0 і 98,9 $\text{мМ}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ — у випадку застосування SDS і СТМАВ, відповідно. Останній варіант визначення хрому(III) чутливіший порівняно із дифенілкарбазидним методом у 3 рази. Нижня межа чутливості хромазуольного методу становить близько 100 і 25 нг хрому в 1 мл фотометрованої проби для двох варіантів аналізу із застосуванням SDS і СТМАВ, відповідно. Оптимізовано зручний і порівняно швидкий метод мінералізації біологічних зразків з використанням пергідролу у присутності сірчаної кислоти. Розроблені методи аналізу можна застосовувати для моніторингу процесів відновлення хромату культурами дріжджів з утворення кінцевого продукту Cr(III), а також для визначення загального вмісту хрому в мікробних культурах чи клітинах після їх мінералізації.

Ключові слова: хром(III), хромазуол S, додецилсульфат натрію, цетилтриметиламмонійбромід, фотометричний аналіз, культура дріжджів.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ
ХРОМА(III) В ДРОЖЖЕВЫХ КУЛЬТУРАХ
С ПОМОЩЬЮ ХРОМАЗУРОЛА S
И ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ
ВЕЩЕСТВ ДЛЯ СКРИНИНГА ПРОЦЕССОВ
БИОРЕМЕДИАЦИИ ХРОМАТА**

*Т. М. Гончар¹, Г. П. Кшеминская¹,
И. О. Пацай², А. М. Гута²,
М. В. Гончар¹*

¹Інститут біології клітки НАН України,
г. Львов

²Львовский национальный университет
им. Ивана Франко, г. Львов

E-mail: gonchar@cellbiol.lviv.ua

Поскольку микроорганизмы рассматриваются как перспективное средство для биоремедиации соединений хрома, а дрожжи — как источник биоконплексов хрома фармацевтического значения, актуальной биотехнологической проблемой является разработка методов определения содержания хрома в реальных образцах биологического происхождения. Разработан новый чувствительный метод фотометрического определения суммарного хрома в форме Cr(III) в микробных культурах после их минерализации с использованием реакции с хромазуолом S в присутствии поверхностно-активных веществ (ПАВ) — додецилсульфата натрия (SDS) или цетилтриметиламмонийбромида (СТМАВ). Найденны оптимальные величины концентрации хромазуола S и ПАВ для достижения максимальной чувствительности анализа. Показано, что молярные коэффициенты экстинкции комплексов в 0,2 М серной кислоте равны 27,0 и 98,9 $\text{мМ}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ — в случае применения SDS и СТМАВ, соответственно. Последний вариант определения хрома(III) превышает по чувствительности дифенілкарбазидный метод определения хромата в 3 раза. Пороговая чувствительность хромазуольного метода составляет 100 и 25 нг хрома в 1 мл фотометрируемого раствора для двух вариантов анализа с применением SDS и СТМАВ, соответственно. Оптимизирован удобный и сравнительно быстрый метод минерализации биологических образцов с использованием пергідролу в присутствии серной кислоты. Разработанные методы анализа применимы для мониторинга процессов восстановления хромата культурами дрожжей по образованию конечного продукта — Cr(III), а также определения общего содержания хрома в микробных культурах или клетках после их минерализации.

Ключевые слова: хром(III), хромазуол S, додецилсульфат натрия, цетилтриметиламмонийбромид, фотометрический анализ, культура дрожжей.

ОЛЕКСАНДР СОЛОМОНОВИЧ ЦИПЕРОВИЧ — ОДИН ІЗ ФУНДАТОРІВ БІОІНДУСТРІЇ ФЕРМЕНТІВ В УКРАЇНІ

*Р. П. Виноградова,
М. В. Колодзейська*

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України, Київ

Придет время, когда слова «биоиндустрия ферментов» мы будем писать без кавычек, ибо использование ферментативного катализа в народном хозяйстве — это наше сегодня и завтра, это один из элементов техники будущего.

А. С. Циперович

Поняття «технічний прогрес» закономірно пов'язують із розвитком науки. При цьому найчастіше мають на увазі вплив на виробництво досягнень фізики, хімії, технічних дисциплін і математики. Біологія ж, як правило, асоціюється з розвитком сільського господарства та медицини. А тим часом у світі існує колосальна за обсягом галузь промисловості, яка є біологічною, а точніше біохімічною, — це промислова або технічна біохімія. Її завданням є створення наукових основ перероблення та зберігання продуктів біологічного походження. Біохімічна промисловість — це вся складна та багатогалузева харчова промисловість, це багато галузей легкої промисловості, низка галузей медицини, фармацевтики. Сюди ж належить нова і дуже перспективна галузь — індустрія ферментів — ефективних прискорювачів різноманітних біохімічних процесів.

У техніці для ферментів відкривається широкий простір. Українці мали невеликі кількості їх з великою швидкістю перетворюють багато субстратів. Змінюючи температуру, кислотність середовища або кількість ферменту, можна впливати тільки на необхідну речовину. Саме завдяки цьому ферментні технологічні процеси можна проводити без складної та дорогої апаратури. Важливим є те, що ферменти працюють у «м'яких» умовах, не потребуючи сильного нагрівання, кислого або лужного середовища, висо-

кого тиску або вакууму, до чого часто вдаються у промисловості.

Якщо до складу сировини входить кілька різних сполук, то, вибравши ферментний катализатор, можна впливати лише на потрібну речовину. А якщо взяти до уваги те, що ферментні білки — це природні сполуки, а сировина для добування їх дешева і доступна (іноді це відходи харчової промисловості), то стає цілком зрозуміло, яке велике значення мають ці катализатори для промисловості.

Надзвичайно цікаві можливості відкриває вивчення та створення ферментних моделей — штучно синтезованих і простих за будовою хімічних сполук, яким притаманна ферментативна активність. Тобто, катализатори майбутнього будуть подібні за своєю дією до ферментів, а в хімічній індустрії дедалі більше запроваджуватимуть ферментний катализ.

Використання ферментів у промисловості спрощує й інтенсифікує виробничі процеси, економить кошти і сировину, дає змогу підвищувати якість продукції, уможливорює створення нових, досі невідомих видів продуктів харчового, технічного та медичного призначення. Академік О. І. Опарін відзначав, що створення великої ферментної промисловості буде новим ступенем у керуванні технологічними процесами під час перероблення біологічної сировини. Важливе значення біохімічної промисловості та технічної біохімії для України зумовлено насамперед тим, що вона має велике, багатогалузеве сільське господарство, розвинену харчову та легку промисловість.

У колишньому Радянському Союзі промислова біохімія почала широко розвиватись у 60-ті роки ХХ ст. завдяки роботі передових наукових установ, особливо Інституту біохімії Академії наук СРСР. Основні ідеї було закладено роботами О. М. Баха та О. І. Опаріна ще у 30-ті роки. Пізніше проблеми



технічної біохімії було значно розширено у працях О. І. Опаріна, Н. М. Сиканяна та інших видатних учених країни. До цієї славної когорти з повним правом можна віднести і О. С. Циперовича, який був фундатором практичних ферментативних досліджень в Інституті біохімії Академії наук України. Саме йому належить розробка технологій виробництва низки ферментативних препаратів і їх впровадження на підприємствах у різних регіонах колишнього СРСР.

О. С. Циперович народився 15 грудня 1910 р. в м. Одесі у сім'ї службовця. Його батько впродовж 10 років був сільським учителем, а після закінчення у 1906 р. юридичного факультету Київського університету ім. Святого Володимира працював за спеціальністю в Києві. Мати — домогосподарка. Обоє їх було розстріляно фашистами в 1941 р. у Києві.

Після закінчення у 1925 р. 7-річної школи О. С. Циперович навчався в Київському хімічному технікумі (до 1929 р.) і одночасно працював в Інституті агрохімії хіміком-техніком. У 1930 р. вступив до Київського державного (зараз національний) університету імені Тараса Шевченка на хімічний факультет, відділення органічної хімії, після закінчення якого отримав диплом хіміка-органіка. Його дипломну роботу помітив проф. С. Н. Реформатський і рекомендував на наукову роботу.

У 1935–1936 рр. О. С. Циперович працював хіміком-дослідником у науковому секторі Київського індустріального (зараз політехнічний) інституту. З квітня 1936 р. до червня 1941 р. — в Інституті біохімії Академії наук УРСР, спочатку молодшим, а згодом — старшим науковим співробітником у відділі ензимології (завідувач — професор Б. І. Гольдштейн).

Згодом О. С. Циперовича зацікавила проблема ферментативного синтезу білкових продуктів. На той час механізм біосинтезу білків був невідомий. Тому Олександр Соломонович поставив завдання дослідити процес синтетичної дії протеолітичних ферментів (папаїну, катепсину) на складних субстратах. Субстратом для синтетичних реакцій слугували різні пептони, наприклад, гідролізат яєчного білка (пептон Вітте), пептон, одержаний під час автолізу свинячих шлунків. Наслідки роботи свідчили, що одержаний пластеїн є продуктом синтетичної дії папаїну, а пероксид водню і кисень пригнічують як гідролітичну, так і синтетичну дію папаїну. Таким чином він уперше

отримав і дослідив пластеїн, який утворювався за участю катепсинів, та вплив окиснювачів й інших регуляторів на хід синтетичних процесів у присутності тканинних протеїназ. Зараз цей підхід зацікавив біотехнологів усього світу.

О. С. Циперович двічі брав участь у конкурсі молодих учених, де отримував другі премії. За цей час він опублікував 12 наукових робіт. Саме в ті роки виявився його інтерес до вивчення тканинних протеїназ — папаїну і катепсину, який поклав початок наступним багаторічним дослідженням протеолітичних ферментів. У квітні 1941 р. Олександр Соломонович захистив кандидатську дисертацію на тему: «Синтетическое действие папаина». У травні того ж року його було затверджено на посаді старшого наукового співробітника.

З перших днів (з липня 1941 р.) і до кінця Великої Вітчизняної війни та навіть після її закінчення (грудень 1945 р.) О. С. Циперович перебував у лавах діючої Радянської Армії. Олександр Соломонович був тяжко поранений, однак після одужання повернувся на фронт. Доля була прихильна до нього — на цій страшній війні він залишився живим (як у Ф. Тютчева: «Все пережить и все-таки жить»).

За військову службу О. С. Циперовича нагороджено орденом «Красная звезда», медалями «За оборону Кавказа», «За победу над Германией в Великой Отечественной войне 1941–45 гг.», «Двадцать лет победы в Великой Отечественной войне», «Пятьдесят лет Вооруженных сил СССР».

Після демобілізації у січні 1946 р. Олександр Соломонович повернувся до Інституту біохімії АН УРСР, «у той завулок з тополями колони», і продовжив інтенсивну науково-дослідну роботу на посаді старшого наукового співробітника лабораторії ферментів, яку очолював академік В. О. Беліцер.

У цій лабораторії він ретельно досліджував механізм денатурації та стабілізації глобулярних білків, у тому числі й протеолітичних ферментів (пепсину, трипсину, хімотрипсину). Серед різних перетворень глобулярних білків *in vitro* денатурація є найпоширенішим явищем. Денатурація — це зміна нативної структури білкової молекули, що пов'язана з її глибокими перетвореннями. Вона впливає на основні загальні та специфічні властивості білка. Дослідження денатурації білків є важливим з теоретичної точки зору і пов'язано зі знанням структури білка, стійкості його нативного

фізико-хімічного стану. Ця проблема також має зв'язок із загальнобіологічними питаннями, зокрема такими, як реакція живої речовини на руйнування клітин і подразнення.

Дослідження денатурації білків є важливим і з практичного погляду, оскільки це явище поширене у багатьох важливих галузях промисловості, зокрема у:

1. Виробництві білкового штучного волокна, білкових пластичних мас, різних типів клеїв; у шкіряній, хутровій, текстильній промисловості, де необхідно отримати максимальний денатуруючий ефект і зберегти його.

2. Виробництві харчових продуктів та їх кулінарній обробці. Такі денатуруючі дії, як нагрівання, сушіння, заморожування, соління тощо істотно впливають на засвоєння, ступінь повноцінності, збереження харчових і кормових продуктів.

3. Виробництві білкових медичних препаратів — сироваток, вакцин, білків крові, сухої плазми, токсинів, гормонів, ферментів тощо. Більшість активних білків чутливі до денатурації, тому збереження їх у нативному стані у виробничому процесі є дуже важливим і, водночас, складним завданням. При цьому денатурація може відігравати й позитивну роль, даючи можливість отримати бажані зміни властивостей білків, зокрема імунохімічних, а також позбавитись баластних білків.

4. Виробництві технічних препаратів ферментів, наприклад пепсину і сичужного ферменту для виготовлення сирів, казеїну; технічного панкреатину для пом'якшення та знежирювання шкіри; пепсину і трипсину для виробництва бактеріологічних середовищ; технічних препаратів амілази, каталази, ліпази та інших ферментів, які використовують у різних галузях індустрії. При цьому необхідно зберегти ферменти від денатурації.

5. Виробництві та зберіганні харчових концентратів (сухого молока, ячного порошку) тощо.

Проблема стабілізації білків не менш, а може і більш важлива, ніж денатурація. Усі ці питання у 50-ті роки ХХ ст. були далекими від вирішення, і саме вони зацікавили Олександра Соломоновича.

Так, він виявив передденатураційні зміни у білках; стрибкоподібний характер змін білкової молекули під час теплової денатурації; постденатураційні зміни білків; дослідив вплив іонів солей та сечовини на процес денатурації білків; вплив жирних кислот та ефіру на стійкість глобулярних білків до денатурації.

О. С. Циперович запропонував схему денатураційного процесу білків. Йому належить відкриття явища «денатураційної стабілізації» білків, тобто підвищення стабілізації під впливом денатуруючих факторів, але не в надто високих концентраціях. Значний інтерес становлять його дослідження механізму стабілізуючої дії на протеїнази продуктів розпаду білків, навіть до окремих амінокислот. Показано, що стабільність усієї макроструктури ферментного білка залежить від стану його активного центру — якщо останній специфічно блокований (зв'язаний із субстратом), то вона значно підвищується.

Запобігання денатурації та стабілізація білків у процесі виробництва є одним з основних принципів технології білкових речовин. Вивчення і оцінка їх з погляду технологічних схем та їхніх окремих етапів відкриває широкі можливості для значного поліпшення та раціоналізації відповідних промислових виробництв. О. С. Циперович обрав виробництво глобулярного білка пепсину. Спочатку було підібрано метод визначення активності пепсину, заснований на розщепленні ферментом кристалічного едестину, який запропоновано також і для використання у виробничих умовах.

Робота проводилась у двох напрямках: було поетапно проаналізовано основні технологічні схеми виробництва пепсину і виявлено саме ті етапи, на яких фермент денатурує найбільшою мірою (оброблення ефіром, вакуум-випаровування, нейтралізація тощо). З другого боку, вивчали можливість стабілізації пепсину на різних етапах технологічного процесу.

Виявлено, що фермент у концентрованих автолізатах слизової оболонки шлунка свині (основна сировина) виключно стабільний. Як з'ясувалося, ця стійкість зумовлена сильною стабілізуючою дією продуктів пептичного розщеплення білків самої слизової оболонки, а також продуктів перетравлення ячного білка або едестину. Стабілізуючий ефект значно підвищується зі збільшенням концентрації продуктів розщеплення у розчині. Тому з метою якнайповнішого збереження активного пепсину впродовж усіх виробничих операцій запропоновано найбільш ефективний автоліз слизової оболонки, що відбувається в умовах мінімальної кількості води. Дослідження показали, що в цих умовах пепсин найстабільніший, не інактивується з додаванням значної кількості кислоти до тканини під час зберігання й оброблення ферментних

розчинів (автолізатів). Водночас у концентрованих розчинах амінокислот — гліцину та тирозину — стабілізація пепсину не відбувається.

З урахуванням даних про денатурацію і стабілізацію пепсину в лабораторних умовах було розроблено новий метод автолізу ферментвмісної тканини (слизової оболонки шлунка свині) — «безводний автоліз», який відбувається практично без додавання води до тканини. Цей метод дав можливість вилучити з виробництва більшість денатуруючих операцій, стабілізувати пепсин на всіх етапах технологічного процесу, значно підвищити вихід ферменту, виключити більш складне обладнання, тобто значно поліпшити і спростити виробництво біопрепаратів, які містять пепсин.

На основі запропонованого методу автолізу розроблено нові технологічні схеми виробництва: а) препарату «Медичний пепсин» (авторське свідоцтво №88356 з Державного реєстру винаходів); б) препарату «Штучний шлунковий сік» (авторське свідоцтво №89570); в) препарату пепсину підвищеної активності, який використовували для одержання антитоксичних сироваток. Зазначені методи становлять єдиний комплекс виробничих процесів, технологічно пов'язаних між собою. Практика показала, що вони достатньо прості, придатні для широкого використання, навіть для виробників з найпростішим оснащенням, оскільки найскладніші технологічні процеси з виробництва вилучено.

Новий метод одержання пепсину протягом 1950–1951 рр. було впроваджено на різних вітчизняних виробництвах. Першим упровадив цей метод у виробництво пепсину Московський м'ясокомбінат ім. А. І. Мікояна. Розробки О. С. Циперовича дозволили отримати препарати кращої якості, а також істотно заощаджувати основний матеріал та низку допоміжних, що дало загалом значний економічний ефект. Принцип «безводного автолізу» було використано також для розроблення нових методів виробництва інших протеолітичних ферментів, наприклад трипсину. Ця робота слугує ілюстрацією великого практичного значення досліджень денатурації та стабілізації білків. «Мало знати, треба й використовувати», — це принцип роботи Олександра Соломоновича.

Накопичений експериментальний матеріал О. С. Циперович виклав у дисертації на здобуття вченого ступеня доктора біологічних наук на тему «Исследование денатурации и стабилизации глобулярных

белков», яку він захистив 10 грудня 1954 р. на спеціалізованій раді Харківського державного університету ім. О. М. Горького (зараз Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна). У тому ж році Олександра Соломоновича було нагороджено орденом «Знак Почета» за вислугу років і бездоганну роботу в системі Академії наук УРСР.

Разом з К. М. Веремєєнко О. С. Циперович одержав (1961 р.) препарат кристалічного трипсину для парентерального введення. У дослідях на тваринах (щурах) показано, що він малотоксичний, має протинабрякову дію, сприяє збільшенню судинної проникності, прискорюючи переміщення мединалу у мозок. Цей препарат пройшов перевірки у різних клініках м. Києва. На основі різнобічних клінічних спостережень було розроблено інструкцію для використання кристалічного трипсину, затверджену Фармакологічним комітетом МОЗ СРСР, а також запропоновано технологічні умови для виробництва лікарського препарату «кристалічний трипсин», теж затверджені фармкомітетом.

Лабораторію ферментів у 1962 р. було перейменовано на лабораторію білків крові Інституту біохімії, де продовжував працювати О. С. Циперович. Відповідно до постанови ЦК КПРС та Ради Міністрів СРСР від 3 січня 1963 р. «О мерах по дальнейшему развитию биологической науки и укреплению ее связи с практикой» було здійснено реорганізацію структури Інституту з метою розвитку нових наукових напрямів. В Інституті створено п'ять нових лабораторій, одна з яких — хімії та біохімії ферментів. Завідувачем саме цієї лабораторії і було призначено Олександра Соломоновича. Академік В. О. Беліцер відзначив, що іншої кандидатури на цю посаду в Інституті немає і запропонувати завідування цією лабораторією можна тільки д.б.н. О. С. Циперовичу. У 1966 р. лабораторії Інституту було реорганізовано у відповідні відділи.

Таким чином, з 1963 р. О. С. Циперович був незмінним завідувачем спочатку лабораторії, а згодом (з 1966 р.) відділу хімії та біохімії ферментів до останніх днів життя.

У 1969 р. Олександру Соломоновичу присвоєно вчене звання «професор» зі спеціальності «Біологічна хімія».

Основний напрям досліджень відділу хімії та біохімії ферментів під керівництвом О. С. Циперовича — вивчення властивостей гідролітичних ферментів з метою використання цих ферментів у різних галузях народного господарства. Вибір цього наукового

напряму був зумовлений не лише необхідністю фундаментального теоретичного дослідження ферментів класу гідролаз і пов'язаних з ними явищ ферментативного гідролізу, але й тим, що саме ферменти цього класу широко використовуються у промисловості, сільському господарстві та медицині. Відділ став першим спеціалізованим науковим підрозділом в Україні, завданням якого було дослідження виключно ферментів і ферментативних процесів. У зв'язку із цим слід наголосити, що проблема ферментів і нині є одним з найголовніших стратегічних завдань науки і техніки з великим майбутнім.

Із класу гідролаз у відділі досліджували в основному пептидгідролази і глікозидази, які є найбільш поширеними і важливими; основні об'єкти — протеїнази, пептидази, амілази і целюлази мікроорганізмів. Властивості мікроорганізмів, їхня пластичність, швидкий темп усіх життєвих процесів дозволяють припустити виявлення в них не тільки нових ферментів, але й нових принципів і механізмів ферментативної дії. Відомо, що мікроорганізми у процесі життєдіяльності продукують різні комплекси ферментів — внутрішньо- або зовнішньоклітинні. У відділі виділяли і досліджували властивості комплексів загалом, що було дуже важливим з огляду на величезне практичне значення їх, а також виділяли й очищували індивідуальні гідролази, вивчали їхні фізико-хімічні, хімічні, біологічні та ферментативні властивості.

Теоретичні дослідження відділу спочатку було спрямовано на вирішення завдань препаративної ензимології, на розроблення методів одержання високоочищених препаратів тваринних і мікробних гідролаз та їх комплексів, на вивчення їхньої гетерогенності. Подібні роботи, окрім безумовного теоретичного значення, створюють запас знань, які необхідні для виробництва й застосування ферментів.

Було розроблено й удосконалено методи кристалізації пепсину, трипсину, хімотрипсину (М. В. Колодзейська, 1966 р.), протеїнази *Streptomyces griseus* (А. Л. Лосева, 1966 р.), α -амілази *Aspergillus oryzae* (І. П. Галич, 1967 р.). Класичну схему кристалізації панкреатичних протеїназ за Нортропом було вдосконалено у 12 операціях. Розроблено методи одержання, очищування мікробних протеолітичних комплексів з метою виділення їх найпростішими прийомами. Так, згодом було виділено, очищено і досліджено протеолітичні (екзоклітинні) комплекси

Asp. flavus (Н. В. Лисенков, 1967 р.), *Asp. oryzae* (М. В. Колодзейська, 1969 р.), *Str. griseus* (А. Л. Лосева, 1970 р.). Окрім суто наукового інтересу до нових ферментів, вивчення їхньої взаємодії і властивостей, такі роботи є вкрай важливими для спрямованої селекції мікроорганізмів і правильної оцінки її результатів.

Особливо цікавим виявився препарат протеїнази із *Streptomyces griseus*, який отримав назву «проназа». Протеїназа, що продукується цим актиноміцетом, має надзвичайно широку специфічність і розщеплює майже всі типи пептидних зв'язків у білках (80–90%), специфічних до трипсину, хімотрипсину, папаїну, катепсину та ряду інших протеолітичних ферментів. О. С. Циперович і співробітники (1966 р.) запропонували дуже зручний і ефективний метод одержання протеїнази *Str. griseus* з культуральної рідини у процесі глибинного вирощування гриба. Метод одержання пронази ґрунтується на осадженні її з культуральної рідини спиртом — ізопропанолом. Одержана проназа — порошок сірого кольору, повністю розчинна у воді, відносно стійка до нагрівання, має високу питому активність.

Подальші дослідження показали, що протеолітичні системи з широкою субстратною специфічністю, подібні до пронази, може синтезувати не тільки *Str. griseus*, але й деякі інші мікроорганізми, наприклад *Asp. oryzae* і *Asp. flavus*. До їхнього складу входять протеїнази трипсинового і хімотрипсинового типів, амінопептидази, зокрема лейцинамінопептидаза, амінотрипептидази, карбоксипептидази та деякі інші дипептидази (М. В. Колодзейська, А. Л. Лосева, Н. В. Лисенков, В. Г. Авдєєв, 1967–1970 рр.).

На завершальних етапах протеолізу беруть участь дипептидази. На той час в СРСР дипептидази не досліджували в жодній лабораторії, в інших країнах їх досліджували мало. У світовій науковій літературі не було жодного огляду з дипептидаз. Коли під керівництвом О. С. Циперовича у відділі розпочали дослідження дипептидаз мікроорганізмів, то відразу було виявлено, що велика кількість цих ферментів міститься в екзоклітинних протеолітичних комплексах, які продукуються аспергілами і деякими актиноміцетами. Разом зі співробітниками Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного АН УРСР виявлено дипептидази (й інші пептидази) у комплексах протеїназ, які синтезуються бактеріями, у тому числі й тими, що їх селекціонували

у відділі промислових мікроорганізмів цього інституту (спільна робота В. Г. Авдеева, І. Д. Колчинської, Є. І. Кваснікова, Н. В. Лисенкова, 1974 р.).

Під час дослідження властивостей мікробних α -амілаз встановлено гетерогенність тричі перекристалізованої α -амілази *Asp. oryzae*; виділено і досліджено препарат α -амілази *Asp. awamory*, очищеної від глюкоамілази; уперше виділено α -амілазу *Asp. flavus*, яку до того часу не було досліджено. Проведено детальне порівняльне вивчення амілаз різних штамів трьох вищезазначених аспергілів і виявлено в них відмінності у структурі та властивостях (І. П. Галич, Т. Ф. Кастрикіна, І. І. Перевозченко, 1969 — 1972 рр.).

Також досліджували C_1 - і C_2 -целюлази, C_X -екзо-, C_X -ендоглюканази і β -глюкозидазу комплексу целюлаз *Asp. awamory*. Для кожного із цих ферментів визначено рН-оптими, які виявилися розташованими в різних ділянках кислої зони. Зміна рН від 8 до 9 істотно гальмувала активність усіх п'яти ферментів. Застосування специфічних інгібіторів дало можливість встановити, що жоден із п'яти ферментів не належить до серинових, тіолових чи металоферментів. Детально вивчено стабільність та умови стабілізації ферментів комплексу целюлаз.

У 70-х роках минулого століття великий інтерес виник до іммобілізованих ферментів, які часто називали ферментами «другого покоління» (після розчинних) і справедливо вважали, що дослідження ферментів в іммобілізованому стані уможливує з'ясування їхніх властивостей та взаємодії у внутрішньоклітинному середовищі. Окрім того, саме іммобілізовані ферменти мають велику перспективу для використання їх у виробництві. У 1973 р. під керівництвом Олександра Соломоновича розпочалися дослідження властивостей (зокрема стабільності) іммобілізованого індивідуального ферменту — кристалічної мікробної α -амілази та ферментативного комплексу протеїназ *Str. griseus*. Іммобілізована амілаза мала високу активність, що пов'язано також з наявністю в ній атомів кальцію. У фіксованому протеолітичному комплексі виявлено групу пептидгідролаз з високою ферментативною активністю.

У відділі вивчали процеси гідролізу, що каталізуються пептидгідролазами та їх комплексами, у дослідках на колагені й желатині (колаген кісток і шкіри, різні желатини), а саме вплив на них трипсину, хімотрипсину та кристалічного комплексу

протеїназ *Str. griseus*. Виявилось, що останній здатен інтенсивно розщеплювати нативний колаген, розриваючи у 4–5 разів більше пептидних зв'язків, ніж трипсин і хімотрипсин, а денатурація білка різко прискорювала цей процес. Протеолітичні комплекси мікроорганізмів інтенсивніше розщеплюють желатин, зокрема 30–31% пептидних зв'язків, тимчасом як трипсин і хімотрипсин — усього 5–7%.

З моменту організації відділу, а також у попередній період зусилля співробітників були спрямовані на розв'язання не тільки теоретичних питань, але й завдань практичного плану, а саме народногосподарського використання ферментів, виробництва і застосування їх. Існував органічний зв'язок між фундаментальними дослідженнями гідролаз, вивченням їхніх властивостей та розробленням наукових основ їх застосування з безпосереднім створенням нових ферментних препаратів або нових технологічних процесів. Вирішуючи практичні завдання, співробітники відділу під керівництвом Олександра Соломоновича прагнули віднайти такі ферменти, які були необхідні для народного господарства. Роботи ці проводили на основі творчих контактів (у тому числі договорів про співпрацю) з іншими науководослідними інститутами, а також промисловими підприємствами. Вони завершилися низкою винаходів, розробленням і впровадженням практичних пропозицій у медицину, хімічну і легку промисловість, сільське господарство.

Так, у результаті досліджень в галузі препаративної ензимології, а також стабілізації і денатурації ферментних білків у відділі спеціально для застосування у медицині створено або розроблено нові способи виробництва таких ферментних препаратів: 1) пепсин медичний; 2) пепсин високоактивний для очищення (виробництва) лікувальних антитоксичних сироваток; 3) препарат «шлунковий сік»; 4) спосіб виробництва кристалічного трипсину; 5) препарат «хімотрипсин високоочищений»; 6) препарат «трипсин високоочищений»; 7) амілаза медична високоочищена із *Asp. oryzae*. Перші три препарати було впроваджено у промисловість, що дало значний економічний ефект. Спосіб виробництва кристалічного трипсину запропоновано для виробництва на заводі біохімічних препаратів в Олайні (Рига, Латвія). Останні три (5, 6, 7) препарати отримали дозвіл Фармакологічного комітету МОЗ СРСР на клінічні випробування, які успішно пройшли в різних медичних

установах Москви, Києва та інших міст. Слід зазначити, що, на відміну від Японії та інших розвинених країн, у СРСР на той час зовсім не було ферментних препаратів для потреб медицини, а інші ферменти випускали в недостатній кількості. А тим часом ферментні препарати є високоефективними лікарськими засобами. Так, кристалічний і високоочищений трипсин загоює рани, застосовується для лікування плевритів, запалення легень, у стоматології та урології, а медична амілаза лікує гастрити, холецистити, поліпшує травлення.

Найкращою сировиною для добування ферментів виявились мікроорганізми. Мікробні клітини виробляють надзвичайно широкий їх асортимент. Мікроби живляться різноманітними речовинами, пристосовуються до будь-яких умов існування і дуже інтенсивно розмножуються. В умовах промислового виробництва деякі з них можуть давати до 1000 «урожаїв» на рік. Швидке розмноження мікроорганізмів, крихітні розміри і чутливість до різноманітних впливів створюють чудові умови для керування процесом вирощування їх в умовах виробництва. Окрім того, ферментні технологічні процеси можна проводити без складної та дорогої апаратури. Тому О. С. Циперович використав саме мікроорганізми з метою одержання ферментних препаратів для промисловості та сільського господарства.

Так, дослідження процесів гідролізу желатину протеїназою *Str. griseus*, зокрема глибини його гідролізу, дозволили розробити нову технологію регенерації срібла і «основи» зі світлочутливих матеріалів. Вона базується на тому, що за допомогою желатину солі срібла, чутливі до світла, приклеюються до основи кіноплівки та фотопаперу. Ця проблема є вкрай важливою. Срібло, завдяки його унікальним фізичним властивостям, широко застосовують у найбільш перспективних галузях техніки — електроніці, в обладнанні обчислювальних машин, прецизійних станків, у різних реле, в автоматичній, авіації тощо. Підраховано, що за теперішніх темпів видобутку срібла його запасів на планеті Земля залишилось на 8–10 років, а замінити його іншими елементами поки що неможливо. У зв'язку з цим особливої ваги набула необхідність регенерації срібла для зниження його безповоротних втрат. Найефективнішим способом регенерації срібла із кінофотоплівок, фотоплівок і фотопаперу є ферментативний, при цьому гідролізується желатиновий шар, а метал

і «основа» (наприклад, тріацетатцелюлозна плівка) вивільнюються.

Із цією метою у відділі було розроблено новий ферментний препарат — «протеназа-1», який містив комплекс пептидгідролаз. Цей препарат розщеплює желатино-білкову суміш на плівках і вивільнює солі срібла. Він діє набагато ефективніше хімічних речовин, використовуваних для очищення плівок. Застосування «протенази-1» уможливило кардинально нову технологію регенерації срібла кінофотоплівок і дозволило: а) об'єднати процеси змиву фотоемульсії, змиву «прошарку» і осадження срібла в одному реакторі; б) організувати замкнений цикл процесу регенерації таким чином, що розчин ферменту, зберігаючи активність значний проміжок часу, повертався для повторного використання, унаслідок чого були відсутні стічні води; в) автоматизувати всі основні етапи регенерації та контроль за ними; г) усунути потребу у кислотостійкому обладнанні, різних хімікатах, нейтралізації і очищенні стічних вод, знизити витрати пари і води. Українським важливим є той факт, що ферментна регенерація дозволяє виключити спалювання плівок і фотопаперу, що вже само по собі дає великий економічний ефект. У нашій країні були й дотепер існують десятки тисяч установ, в яких має місце втрата срібла, а також плівок і фотопаперу. О. С. Циперович, А. І. Златопольський та І. Ф. Мішунін у 1969 р. отримали авторське свідоцтво СРСР з Державного реєстру винаходів за «Способ регенерации серебра из фотопленок и фотобумаги».

Проведені у відділі під керівництвом і за безпосередньою участю О. С. Циперовича дослідження властивостей мікробних комплексів пептидгідролаз набули практичного застосування в сільському господарстві, зокрема у тваринництві. Основні наслідки цих досліджень детально викладено у роботі О. С. Циперовича «Протеолитические ферменты в животноводстве», яку опубліковано в журналі «Вісник АН УРСР», № 4, 1972 р. Було запропоновано використовувати препарати, які містять мікробні комплекси протеолітичних ферментів та найінтенсивніше розщеплюють білки, для вирішення деяких основних завдань проблеми білка у тваринництві, зокрема для підвищення коефіцієнта використання білків під час вирощування передусім молодняку (свиней, курей), а також для відгодівлі дорослих тварин з метою продукування ними такої білкової продукції, як молоко, вовна тощо.

Першим із розроблених у відділі подібних препаратів був «протезим», який містив потужну протеолітичну систему *Str. griseus*, а також певну кількість стрептоміцину і міцелію актиноміцету, тобто фактично був ферментно-антибіотичним препаратом. О. С. Циперович і Л. Г. Кондратьєва отримали авторське свідоцтво СРСР з Державного реєстру винаходів за «Способ получения препарата для выращивания и откорма молодняка животных» (1971 р.). Застосування цього препарату у Полтавському науководослідному інституті свинарства під час вирощування поросят-сисунців забезпечило значний приріст маси (12–19%), зниження шлунково-кишкових розладів і падежу тварин. Потенційний економічний ефект цієї роботи мав становити понад 50 млн. крб. на рік тільки по Україні. Препарат було використано також і в птахівництві та у вирощуванні молодняка великої рогатої худоби. Отже, дослідження під керівництвом О. С. Циперовича мікробних протеолітичних комплексів для гідролізу білків, у тому числі й кормових, дозволило підвищити процент використання кормових білків під час вирощування передусім молодняка (свиней, курей), а також відгодівлі дорослих тварин. Ефективним у цьому сенсі виявився ферментно-антибіотичний препарат «протезим», який дав позитивні результати у відгодівлі не тільки поросят-сисунців, але й бройлерів.

Для тваринництва запропоновано ще один препарат — «протеназа-1», досліджений у співпраці з Інститутом ботаніки ім. І. Д. Холодного АН УРСР. Цей препарат з комплексом пептидгідролаз виявляв ефективність щодо гідролізу клітин хлорели, внаслідок чого з них вивільнювались цінні внутрішньоклітинні компоненти, використовувані як корм для тварин. За розроблення способу ферментного гідролізу біомаси зелених водоростей О. С. Циперович, А. Ф. Бернштейн, Н. В. Костлан, Е. С. Несторова у 1972 р. отримали авторське свідоцтво СРСР на винахід.

Більшість винаходів і способів виробництва ферментних препаратів О. С. Циперовича було широко впроваджено в народне господарство й дало економічний ефект, який обчислювався мільйонами карбованців. Можна з упевненістю стверджувати, що всі наукові розробки Олександра Соломоновича й дотепер мають величезні потенційні можливості для створення промисловості ферментів (ензимоіндустрії) в Україні, а саме: виробництва медичних препаратів,

препаратів для сільського господарства, харчової, хімічної та легкої промисловості.

Разом із групою дослідників О. С. Циперович запропонував застосовувати мікробні протеїнази у процесі холодного електрокопчення та пряного засолювання риби. Використання ферментного препарату дозволило скоротити цикл холодного копчення із 40–48 год до 1,5–2 год, а час пряного засолювання — у 3–5 разів зі значним поліпшенням якості продуктів (1968 р.).

Олександр Соломонович опублікував 187 наукових робіт; він є автором 10 винаходів. Ним було запропоновано дві прості конструкції автоматичного колектора фракцій для колонкової хроматографії, а також сифондозатори до них — прилади карусельного типу (1963 р.).

Широко відомі його монографії: «Ферменты в промышленности» (1962 р.), «Ферменты в народном хозяйстве» (1965 р.), «Ферменты. Основы химии и технологии» (1971 р.). Останню перекладено польською мовою і видано у Польщі (1974 р.). Цікавою є його оглядова стаття «Исследования в области гидролитических ферментов» («Укр. біохім. журн.», 1975 р.).

Олександр Соломонович був талановитим популяризатором як своїх наукових досягнень, так і науки загалом. Він виступав перед різними категоріями слухачів у багатьох куточках колишнього Радянського Союзу з лекціями про ферменти, про роль біологічних катализаторів у розвитку технічного прогресу тощо. Його роботи «Природные катализаторы» (1960 р.), «Сучасне і майбутнє ферментів» (1962 р.), «Ферменты и завтрашний день» (1963 р.) та інші опубліковано у престижному науково-популярному виданні «Наука и жизнь», а статтю «Индустрия ферментов» — у газеті «Правда Украины» (1961 р.). Монографія «Биология и технический прогресс. Настоящее и будущее» (1972 р.) у співавторстві з І. П. Галич отримала диплом на Всесоюзному конкурсі науково-популярної літератури у 1973 р.

Олександр Соломонович дуже вміло поєднував роботу талановитого науковця-експериментатора, організатора, популяризатора науки та педагога. Упродовж багатьох років він читав підготовлений ним спецкурс із ферментів на кафедрі біохімії біологічного факультету Київського державного (зараз національний) університету імені Тараса Шевченка.

О. С. Циперович багато виступав з доповідями на біохімічних з'їздах, всесоюзних і республіканських наукових конфе-

ренціях, сесіях біологічного відділення Академії наук УРСР, конференціях Інституту біохімії АН УРСР. Він був членом декількох наукових рад, у тому числі наукової ради з проблеми ферментів при Держкомітеті Ради Міністрів СРСР з науки і техніки, Ради головного управління мікробіологічної промисловості Ради Міністрів СРСР, членом ученої ради Інституту біохімії та редакційної колегії «Українського біохімічного журналу».

Олександр Соломонович був прекрасним, турботливим науковим керівником, який міг не тільки поставити перед співробітником перспективне завдання, але й допомагав виконавцям повірити у свої сили та у його вирішення. Вийшовши зі школи академіка В. О. Беліцера, він створив дружній творчий колектив, який став школою українських ензимологів. Усі співробітники, які прийшли до нього у відділ після закінчення вузу, відбулись як справжні науковці й у подальшому працювали та продовжують працювати в галузі ензимології у різних наукових, навчальних або інших установах України. Атмосфера для наукового зростання у відділі була найсприятливішою, його девіз — «ні дня без експерименту». Олександр Соломонович сам був дуже організованою, пунктуальною людиною і вимагав від співробітників не лише дотримуватись розпорядку робочого дня, але й звітувати кожних два тижні за проведену наукову роботу. Він готував односторонні, які б могли продовжити розпочату ним справу, любив і цінував своїх співробітників та студентів.

За науковою тематикою відділу під керівництвом О. С. Циперовича підготовлено 13 кандидатів наук: А. Л. Лосєва, Т. А. Галкіна, М. В. Колодзейська, І. П. Галич, М. В. Лисенков, І. І. Перевозченко, Л. О. Коноплич, І. Ф. Мішунін, Т. М. Сургова, Г. Ф. Карпенко, Г. С. Пилявська, Л. О. Колесник, С. В. Вербиленко. Троє останніх захищали кандидатські дисертації вже після раптової смерті О. С. Циперовича. Як продовження його думок та ідей вийшли у світ також монографії його учнів: М. В. Колодзейської, Г. С. Пилявської «Пептидази» (1982 р.); І. П. Галич «Амилази мікроорганізмів» (1987 р.); І. Ф. Мішуніна, М. І. Шевченко «Этюды биотехнологии» (1989 р.). Мрією О. С. Циперовича було створення самостійного інституту з вивчення ферментів та експериментального підприємства з виробництва ферментних препаратів в Україні. Він підготував проект такого виробництва.

З пропозицією створити спеціальний інститут, роботу якого було б спрямовано на вивчення властивостей ферментів і розроблення технологічних процесів їх використання, Олександр Соломонович звернувся до президента Академії наук Української РСР академіка Б. Є. Патона у грудні 1970 р. Він запропонував декілька назв інституту: «Інститут хімії та технології ферментів», «Інститут біохімії та технології ферментів», «Інститут теоретичної та прикладної ензимології» або просто «Інститут ферментів».

Організація інституту необхідна, за аргументами О. С. Циперовича, з таких причин:

1. Проблема ферментів виросла в одне з найбільших стратегічних завдань науки і техніки такого масштабу, як, наприклад, проблема атомної енергії. Ферментні препарати використовуються в найважливіших галузях людської діяльності — у харчовій, легкій, хімічній промисловості, сільському господарстві, медицині й навіть у комунальному господарстві. Майбутнє ферментів значно більше за їхнє сучасне.

2. У Радянському Союзі немає жодного інституту, який би займався вивченням тільки ферментів. Роботи ведуться у багатьох організаціях, різних за профілем і спрямуванням наукових досліджень.

3. Впровадження завершених робіт із ферментів часто дає значний економічний ефект. Використання таких робіт може не тільки забезпечити коштами новий інститут, але й принесе державі значний прибуток.

4. СРСР істотно відстає від ряду зарубіжних країн у галузі вивчення та використання ферментативного каталізу.

5. Необхідно значно розширити підготовку кадрів у даній галузі, передусім учених (теоретиків і технологів).

6. Україна має велику можливість використання ферментів і велику потребу в них, оскільки є країною з розвинутою промисловістю і багатогалузевим сільським господарством.

7. Інститут ферментів у системі Академії наук УРСР міг би координувати всі роботи з вивчення та використання ферментів в Україні, готувати необхідні матеріали для керівних організацій та уряду.

О. С. Циперович вважав, що інститут має бути «однопроблемним», тобто мати єдину мету, один основний напрям; дуже важливо, щоб була єдність теоретичних і практичних завдань, їх органічний зв'язок. Він запропонував структуру інституту, яка включала б такі основні відділи: 1) препаративної хімії; 2) хімічної структури ферментів; 3) денатурації та стабілізації ферментних

білків; 4) протеолітичних ферментів; 5) глюкозилаз (може включати декілька лабораторій або груп); 6) механізмів ферментативного гідролізу; 7) ферментативного гідролізу білків і пептидів; 8) ферментативного гідролізу полісахаридів; 9) технологій виробництва ферментних препаратів; 10) основ використання ферментів (з групою економічних досліджень); 11) сільськогосподарської ензимології; 12) промислової ензимології. Окрім основних відділів він вважав за необхідне мати допоміжний мікробіологічний відділ та експериментальне виробництво (пілотний завод) ферментних препаратів.

Запропонована Олександром Соломоновичем структура інституту така, що він у змозі довести будь-яку з робіт до повного біотехнологічного завершення — від початку теоретичних досліджень до створення спочатку лабораторного, а потім і технологічного регламенту, проведення напіввиробничих робіт і, врешті-решт, упровадження, тобто передання підготовленої технології виробництву для одержання цільового продукту. При цьому полегшується можливість комплексного (колективного) вирішення завдань силами різних відділів інституту, можливість їхньої узгодженої роботи.

О. С. Циперович запропонував наукові та практичні напрями кожного відділу, виходячи із загальних завдань інституту, приблизно на 7–8 років. Окрім того він визначив розміри інституту, вартість і строки зведення будівлі. Найкращим варіантом є створення спочатку сучасної експериментальної бази інституту і спеціального приміщення для нього у Феофанії поряд з Інститутом мікробіології і вірусології та Інститутом молекулярної біології та генетики АН УРСР.

У листі до президента Академії наук УРСР акад. Б. Є. Патона О. С. Циперович особливо наголосив, «что важнейшим организационным моментом является наиболее быстрое создание экспериментального производства ферментов (теперь пилотного завода). Именно оно позволит в кратчайший срок расширить и выполнить работы, имеющие народнохозяйственное значение, которые смогут дать, в частности, значительный экономический эффект». А такі технологічні розробки у нього на той час були у значній кількості.

Плани і пропозиції О. С. Циперовича не було втілено у життя, а його фізичні сили було вичерпано постійною боротьбою за впровадження і практичне використання вкрай важливих наукових розробок.

Видатний авіаконструктор О. К. Антонов сказав: «Есть на свете три прекрасные сестры: вера в свои силы, надежда на победу и любовь к жизни. . . С ними я не хотел бы расстаться до того дня, когда перестанет существовать мое собственное «я». Такою людиною був і Олександр Соломонович.

Пішов із життя О. С. Циперович раптово 20 грудня 1976 р. у розквіті сил, наукових планів і задумів. Поховано його на Байковому цвинтарі м. Києва.

Олександр Соломонович назавжди залишиться в серцях його колег і вдячних учнів як відомий вчений-ензимолог, безмежно відданий науці, великий ентузіаст, чий науковий праць є найвагомим внеском у розвиток теоретичної ензимології та створення індустрії ферментів в Україні.

О. С. Циперович був людиною сильного розуму, широкої ерудиції, надзвичайного таланту, абсолютної чесності й доброти. Віддаючи себе цілком науці, він був справжнім професіоналом і високо цінував професіоналізм інших. Працювати з Олександром Соломоновичем було великим щастям. Він любив класичну музику, літературу, регулярно відвідував оперний театр та концерти у Київській філармонії і водночас, як кожен одесит, дуже любив Леоніда Утьосова та Клавдію Шульженко. У нього було велике почуття гумору, він постійно цитував І. Ільфа та Є. Петрова, любив пожартувати та посміятися.

Олександр Соломонович був аристократом духу, справжнім інтелігентом у найвищому розумінні цього слова і таким залишиться назавжди у пам'яті людей, яким пощастило з ним спілкуватись.

Кожна творча людина залишає учням у спадок свій талант, знання, ідеї, добро. Сомерсет Моєм сказав: «Красота жизни заключается всего-навсего в том, чтобы каждый поступал соответственно со своей природой и со своим делом», що й підтвердив своїм життям О. С. Циперович.

*У статті використано матеріали,
опубліковані в Укр. біохім. журн.,
2007, т. 79, №5.*

Портативний тестер для діагностування пташиного грипу

Експерти Організації з продовольства і сільського господарства — ФАО (Food and Agriculture Organization — FAO) при ООН працюють над портативним пристроєм, здатним діагностувати пташиний грип. За словами представників організації, поточна версія пристрою має розміри невеликого телевізора й коштує близько 1000 дол. США, проте згодом планується випустити апарат значно менших розмірів. Як відзначає Джон Кроутер, зайнятий у дослідницькій програмі, ініційованій ФАО і Міжнародним агентством з атомної енергії, подібні мініатюрні тестери дають змогу проводити аналіз у будь-яких умовах без участі медичного персоналу. Володіючи мінімумом знань про пристрій, провести аналіз зможе будь-хто з бажаними. Розробники сподіваються, що незабаром портативний тестер кардинально змінить методику діагностування пташиного грипу. Особливо корисним мініатюрний аналізатор може стати для фермерів, які зможуть оперативно надсилати результати аналізу в найближчий медичний центр, скажімо, за допомогою SMS. Наприкінці минулого року в рамках спільного науково-прикладного проекту IT-компанії Voxiva та Асоціації GSM було розроблено спеціалізоване програмне забезпечення, яке допоможе лікарям, використовуючи центральну базу даних, повідомляти один одного про спалахи епідемій, стан хворих і наявність необхідних ліків. За чотири роки високопатогенний вірус пташиного грипу було виявлено на території понад 50 країн, включаючи Китай і Великобританію; відзначено спалахи і на території Росії. Епідеміологи побоюються, що вірус може мутувати у форму, що передається від людини до людини, а це може спричинити пандемію. На сьогодні за даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), вірусом заразилися 278 чоловік, 168 з яких померли. Створення портативного тестера стане одним із предметів обговорення фахівців на конференції експертів із пташиного грипу, яка відбудеться у Вероне (Італія).

Джерело:

Інтернет-журнал «Комерційна біотехнологія» <http://www.cbio.ru/> за матеріалами <http://www.pharmvestnik.ru>

Штучні протоклітини синтезують ДНК без допомоги ферментів

Американські біологи зробили важливий крок до розуміння початкових етапів зародження життя. Їм вдалося створити «протоклітину» з оболонкою з простих ліпідів і жирних кислот, здатну втягувати з навколишнього середовища активовані нуклеотиди — «цеглу», необхідну для синтезу ДНК. Протоклітина не може самостійно здійснювати матричний синтез (реплікацію) ДНК від початку і до кінця, але успішно справляється з найважливішими етапами цього процесу, причому всі реакції відбуваються без участі білків або інших складних біологічних молекул-каталізаторів. Один із ключових аспектів проблеми походження життя — це питання про те, який тип обміну речовин був у перших живих організмів. Одні учені, йдучи за академіком О. І. Опаріним, вважають, що перші «протоклітини» були гетеротрофами, тобто споживачами готової органіки, розчиненої у водах стародавніх водоймищ (теорія «первинного бульйону»). Або, можливо, життя зародилось у тріщинах і порожнинах гірських порід чи у гідротермальних джерелах, де їжею першим організмам слугувала органіка, що утворюється в надрах Землі. Інші експерти вважають за ймовірніше, що перші організми були автотрофами, тобто не потребували готової органіки і синтезували її самі з вуглекислого газу та інших простих речовин, використовуючи для цього енергію окислювально-відновних реакцій (хемоавтотрофи) або світла (фотоавтотрофи). Утім, ідея про первинність фотоавтотрофів видається сумнівною, оскільки дані порівняльної геноміки переконливо свідчать про пізнішу появу фотосинтезу порівняно з деякими типами хемоавтотрофного метаболізму, такими як метаногенез та анаеробне окиснення метану. Молекулярні дані, проте, поки що не дають виразної відповіді на питання, хто з'явився раніше — гетеротрофи чи хемоавтотрофи. На користь первинності гетеротрофів свідчить передусім той очевидний факт, що їхній обмін речовин загалом організований простіше. Використовувати готову органіку для побудови власних клітин мають усі живі організми, але автотрофам потрібно додатково синтезувати цю органіку самим із простих молекул.

Логічно припустити, що здатність до утилізації CO₂ і синтезу органіки розвинулася пізніше як «надбудова» до гетеротрофного метаболізму. Проте висувуються і серйозні докази проти ідеї щодо первинності гетеротрофів. Один з них полягає в тому, що оскільки всі живі організми розмножуються в геометричній прогресії, то найперша гетеротрофна форма життя, що з'явилася на планеті, з'їла б увесь «первинний бульйон», скільки б його не було, за нікчемний за геологічними мірками термін. Вона б просто не встигла за цей час пройти весь шлях еволюційного розвитку, необхідний для перетворення гетеротрофного організму на автотрофний. На це можна заперечити, що «бульйон» потроху підживлювався органікою, що утворюється, наприклад, у ході геохімічних процесів у надрах планети. Інший аргумент відвести важче. Мембрани (оболонки) сучасних клітин складаються з фосфоліпідів, і ці мембрани практично непроникні для полярних і заряджених молекул, зокрема для складних органічних сполук, таких як цукри або нуклеотиди. Щоб транспортувати ці молекули через мембрану, у сучасних клітин є набір спеціальних транспортних білків. На початку життя таких білків, звичайно, не могло бути. Отже, протоклітина просто не могла отримувати складну органіку із зовнішнього середовища. Вона мала задовольнятися тими простими неорганічними молекулами, які здатні проходити через фосфоліпідну мембрану без сторонньої допомоги. Висновок: перші живі клітини були автотрофами. Стаття американських біологів, опублікована 4 червня 2008 р. на сайті журналу Nature, є вельми успішною спробою спростувати цей аргумент супротивників «гетеротрофної теорії». Автори виходили з того, що мембрана протоклітин зовсім не обов'язково складалася з тих самих ліпідів, що й мембрани сучасних клітин. Та й первісною «речовиною спадковості» теж не обов'язково мали бути ДНК або РНК в їхній теперішній формі. Стійкі двошарові мембрани (і бульбашки, оточені такими мембранами) походять із безлічі різних ліпідів, жирних кислот, спиртів та інших амфифільних сполук (тобто мають полярну гідрофільну «голову» і гідрофобний вуглеводневий «хвіст»). Такі молекули у воді самі по собі можуть збиратись у двошарові плівки-мембрани: гідрофобні хвости повертаються всередину, якнайдалі від води, а гідрофільні «голови» стирчать назовні, утворюючи обидва поверхневих шари мембрани. Фосфоліпідні молекули досить складні.

Мембрани протоклітин скоріш за все збирались із простіших амфифільних сполук, які могли утворюватись абіогенним шляхом. Автори вивчили властивості маленьких бульбашок (розміром у сотні нанометрів, що можна порівняти з найдрібнішими живими клітинами), оточених мембранами з різних жирних кислот. Спочатку вони намагалися з'ясувати, від чого залежить проникність мембран для простих органічних сполук, таких як цукор рибоза (цей цукор є однією з необхідних складових частин нуклеотидів, з яких, у свою чергу, збираються молекули РНК і ДНК). З'ясувалося, що мембрани, зроблені з простих жирних кислот, пропускають рибозу трохи краще, ніж фосфоліпідні мембрани, але все-таки погано. Проте проникність різко зростає, якщо використовувати суміш жирної кислоти з моноєфіром цієї ж кислоти та гліцеролу. Численні експерименти показали, що проникність мембрани залежить передусім від форми молекул, з яких вона зроблена: чим більшою є «голова» молекули відносно довжини «хвоста», тим вища проникність. Наприклад, у жирних кислот роль «голови» відіграє маленька за розміром карбоксильна група (–COOH). Довгі гідрофобні «хвости» у товщі мембрани розташовуються тісно і щільно злипаються один з одним. У гліцеролового ефіру тієї самої жирної кислоти «головою» слугує молекула гліцеролу, що є набагато більшою. Через це гідрофобні «хвости» у товщі мембрани розміщуються вільніше, і вся конструкція в цілому виявляється більш рихлою, плинною і рухомою. На основі виконаних експериментів автори запропонували теоретичну модель проходження заряджених молекул через мембрани. Вони знайшли декілька варіантів складу мембрани, за яких її проникність для рибози виявляється високою. Подальші експерименти проводилися з двома із цих варіантів. Перший з них — суміш міристолеїнової кислоти з її ж гліцероловим моноєфіром. Ця суміш дає стійкі бульбашки із задовільною проникністю, однак у неї є один недолік: міристолеїнова кислота містить 14 атомів вуглецю та один подвійний зв'язок, і її присутність у «первинному бульйоні» в достатньо високих концентраціях вважають малоюмовірною. Другий варіант — суміш деканової кислоти з відповідним гліцероловим моноєфіром і декановим спиртом. Ця суміш є ближчою до реальної (тобто до тієї, що могла бути у «первинному бульйоні»), оскільки в декановій кислоті всього 10 атомів вуглецю і немає подвійних

зв'язків. Згодом автори розпочали вивчення проникності цих бульбашок стосовно активованих нуклеотидів — тієї «цегли», з якої клітина збирає молекули РНК і ДНК. Якщо реальні протоклітини були гетеротрофами, такі нуклеотиди мали складати їхню головну «їжу». Сучасні клітини використовують нуклеотиди з трьома приєднаними до них залишками фосфорної кислоти (нуклеотидтрифосфати). Проте нуклеотидтрифосфати, як з'ясувалося, рішуче «відмовляються» проходити крізь будь-які ліпідні мембрани. Причина в тому, що вони несуть дуже сильний негативний заряд. У нуклеотиддифосфатів і нуклеотидмонофосфатів заряду менше, і їм вдається пройти крізь міристолейнові та деканові мембрани, але з такої «цегли» ДНК сама по собі не синтезується. Проте й тут знайшовся обхідний шлях. Нуклеотиди можна активувати іншим способом, приєднавши до них замість трьох фосфатів один і молекулу імідазолу (проста органічна сполука, має велике поширення в живій природі і є складовою частиною однієї з 20 «канонічних» амінокислот — гістидину). Нуклеотиди, активовані імідазолом, придатні для синтезу ДНК і РНК, але мають тільки один негативний заряд, а не чотири, як нуклеотидтрифосфати. Такі нуклеотиди вже застосовувалися раніше в експериментах із синтезу нуклеїнових кислот без участі ферментів. Як і очікувалось, нуклеотиди, активовані імідазолом, достатньо вільно проходили крізь міристолейнові й деканові мембрани. Цей успіх надихнув авторів на спробу створення штучної протоклітини, яка б «харчувалася» активованими нуклеотидами та здійснювала матричний синтез молекул ДНК або РНК без допомоги ферментів. На сьогодні хіміки вже досягли певних успіхів у вивченні неферментативної реплікації нуклеїнових кислот. Проте умови, необхідні для проходження повного циклу реплікації без допомоги білків, поки що не вдалося підібрати. Залишилися дві головні невирішені проблеми. По-перше, досі не знайдено умови, в яких відбувався би сам собою матричний синтез будь-якої молекули ДНК або РНК незалежно від послідовності нуклеотидів у матриці. Одні послідовності вдається реплікувати, інші — ні. По-друге, аби процес реплікації розпочався, потрібна «приманка» — праймер. Це означає, що якщо узяти просту одноланцюгову молекулу ДНК або РНК, то на такій матриці без допомоги ферментів реплікація не розпочинається і доводиться все-таки вдаватися до використання ферментів. Але якщо

частина нуклеотидів другого (комплементарного) ланцюжка вже стоїть на своїх місцях, то процес реплікації може за певних умов продовжуватись і без допомоги ферментів. І це вже немало. Якби повний цикл неферментативної реплікації НК було вже відкрито, то автори обговорюваної статті, мабуть, підійшли б упритул до створення справжнього живого організму. Натомість їм довелося задовольнитися тим, що є. Вони взяли короткі молекули ДНК з праймером і з недореплікованим «хвостом», що складається з 15 нуклеотидів Ц (цитидинів). Молекули розмістили всередину мембранних бульбашок. Ці бульбашки з начинкою — модельні протоклітини — помістили в середовище, оптимальне для неферментативного синтезу ДНК. Після цього вони почали отримувати «їжу» — активовані нуклеотиди. Офіційна назва «корму»: 2'-аміно-2',3'-дидеоксигуанозин-5'-фосфорімідазол. Час від часу частину протоклітин витягували з розчину, щоб подивитися, як відбувається реплікація. Йшла вона добре, хоч і поволі. Врешті-решт всі протоклітини справилися із завданням, тобто закінчили реплікацію недореплікованих молекул ДНК, прибудували до кожного з 15 цитидинів комплементарний йому гуанозин. На це у них пішло 24 год, по 96 хв на нуклеотид. У справжніх живих клітинах реплікація ДНК здійснюється в десятки мільйонів разів швидше, але ж там є недефективні катализатори — ферменти. Одержані результати показують, що перші живі клітини все-таки могли бути гетеротрофами. А отже, вже в найближчому майбутньому учені, мабуть, зможуть відтворити в лабораторії всі ключові етапи зародження життя з неживої матерії.

*Автор — Олександр МАРКОВ
Джерело: Sheref S. Mansy, Jason P. Schrum, Mathangi Krishnamurthy, Sylvia Tobř, Douglas A. Treco, Jack W. Szostak.
Template-directed synthesis of a genetic polymer in a model protocell // Nature.
Advance online publication 4 June 2008
(doi:10.1038/nature07018).*

Створено прототип біологічного комп'ютера

Американським ученим вдалося показати, що для складних розрахунків не обов'язково мати суперкомп'ютер — замість цього можна обійтись пробіркою з бактеріями. Попередні результати експерименту зі

створення прототипу біологічного обчислювального пристрою на основі ДНК живих мікроорганізмів було надруковано в *Journal of Biological Engineering*. Про здатність ДНК зберігати й обробляти інформацію відомо давно: генетики підраховали, що в одному ланцюжку молекули може зберігатися такий самий обсяг даних, як у 1000 книг по 500 сторінок кожна. Природно, перед дослідниками постало питання про можливість використання цього унікального ресурсу: відповідні розробки проводяться понад 10 років. Зокрема, відомо про клітини зі штучною генетичною пам'яттю і про галузь біології, яка займається, зокрема, програмуванням генетичних властивостей мікроорганізмів. Групі учених із коледжу Девідсона і університету Міссурі під керівництвом Кармелі Хейнес (Karmella Haunes) уперше вдалося не в теорії, а на практиці продемонструвати обчислювальні можливості ДНК на прикладі бактерій *E. coli*. Дослідники використовували вже згаданий принцип — здатність ланцюжка нуклеотидів обробляти великі масиви даних. Для більшої наочності вони звернулися до відомої в математиці й обчислювальній техніці задачі про млинці, що підгоріли, оптимальне вирішення якої в далекому 1979 р. опублікував сам Білл Гейтс. Суть задачі дуже проста: у її класичному варіанті потрібно за мінімальну кількість перевертань розташувати млинці різного діаметру в найбільш стійкому порядку. Відзначте: тільки перевертати — не перекладати! Оптимальне рішення досягається за два перетворення. Млинці, що підгоріли, — більш «просунута» версія, де сортування необхідно провести так, щоб усі млинці у результаті лежали не тільки стійко, але ще й боком, що підгорів, униз. Отже, сенс завдання про млинці, що підгоріли, полягає в пошуку мінімального числа перестановок. Насправді ця «невикувата» головоломка з комбінаторики демонструє одну з основних функцій, яку виконують комп'ютери, — обробку великих масивів інформації за допомогою перестановки (транспонування) порцій даних. Аналогічний ефект вдалося реалізувати докторові Хейнес і її колегам — шляхом комбінування різних генів та їх перестановки. У ході експерименту окремі ділянки ДНК виконували роль млинців. За допомогою доданого спеціального ферменту експериментатори домоглися можливості впливати на перестановку цих ділянок залежно від реакції на антибіотик тетрациклін. Бактерії *E. coli* не мають власної системи рекомбінації

генів, однак вони детально вивчені і є добре зрозумілими об'єктами для спостереження. У зв'язку з цим дослідники зробили їх модернізацію, забезпечивши клітинним механізмом керування ДНК — ферментом *Hin* — рекомбіназа. За певного розташування і орієнтації «включалася» стійкість до подразника. Та найголовніше: ученим вдалося розташувати «вставки» таким чином, що активність гена, відповідального за стійкість до антибіотика, виявлялася тільки тоді, коли всі блоки ДНК шикувалися в заданій послідовності. При цьому кількість рекомбінацій, необхідних бактеріям для формування стійкості, рівнозначна мінімальному числу переворотів млинців, що підгоріли, які необхідно зробити згідно з умовою наведеної вище задачі. На думку авторів дослідження, аналогічні обчислення у чашці Петрі, що містить мільярди мікроорганізмів, теоретично дозволяють запустити справжній обчислювальний симбіоз: адже кожна бактерія в даному разі є прототипом біологічного комп'ютера. Враховуючи кількість генів у геномі будь-якого живого організму, гіпотетична продуктивність такої «обчислювальної системи» може наблизитися до найпотужніших машин, що існують нині, або навіть перевершити їх. Утім, зараз про це не йдеться: за словами американців, вони поки що проводять лише теоретичні розрахунки для експерименту з великою кількістю «подразників», що впливають на рекомбінацію ДНК.

Джерело: http://www.fizhim.ru/student/biotech/2008/bio_comp_29052008.html

Створено активний серцевий імплантат-сітку

Пітер Уокер (Peter Walker) з університету Лідса і Мартін Льовслі (Martin Levesley) з Інституту інжинірингових систем і проектування (Великобританія) розробили імплантат, який має допомогти пацієнтам зі слабким серцем, назавжди позбавивши їх необхідності вживати спеціальні ліки. Сучасні допоміжні серцеві імплантати викачують кров із шлуночків і спрямовують її в судини, полегшуючи роботу серця. Проте це означає, що кров контактує з пристроєм, зумовлюючи необхідність довічного приймання ліків, які пригнічують імунну систему і виключають процес згортання крові. Також ці насоси можуть ушкоджувати клітини крові, сприяючи закупорюванню судин.

Британські вчені підійшли до вирішення цієї проблеми з іншого боку. Їхній імплантат — це сітка з біологічно сумісної тканини, яку запропоновано обгорнути навколо серця таким чином, щоб вона не контактувала з кровотоком. До речі, це дуже схоже на нещодавній «жакет» для серця, однак тепер «жакет» — активна деталь, а не просто «кожух», що підтримує серцевий м'яз. Як пояснюється у прес-релізі університету, вбудовані в імплантат датчики мають фіксувати наближення нападу й активувати вбудовані мініатюрні приводи, які тимчасово стискуватимуть сітку. Це збільшить тиск у серці і допоможе йому подолати напад, продовжуючи перекачувати кров. «Це дуже проста концепція, яка працює так само, як пластикова пляшка: коли ви її стискаєте, рівень рідини усередині росте», — говорить аспірант Девід Кілінг (David Keeling), який розробив установку для перевірки пристрою. Поки що автори розробки випробовують прототип на стенді й у вигляді комп'ютерної моделі, підбираючи оптимальні параметри стискування сітки (у чому їм допомагають медики). У багатьох випадках у пацієнтів, які одержали «підтримку» у вигляді того чи іншого допоміжного серцевого імплантата, відзначалось не тільки поліпшення стану, але й фактично — самовідновлення серця, якому давали відпочинок.

Джерело: Membrana.ru

«Запальні наноснаряди» вражають пухлинні клітини

Вивчення процесів згоряння на нанорівні привело до створення експериментальної установки, здатної селективно вражати пухлинні клітини. Американські вчені з університету Міссурі-Колумбія спільно з дослідниками з різних військових установ розробили «розумну бомбу» наномасштабу, що може мати безліч застосувань, серед яких найбільш перспективне пов'язано зі здатністю до селективної дії на клітини пухлин. Роботу опубліковано в журналі Applied Physics Letters. Нанобомба є композицією, складеною з нанострижнів оксиду міді (як пального) і наночасток алюмінію (окиснювач). Цій суміші притаманні мала щільність і велика площа контакту пального та окиснювача. Такі властивості в наномасштабі можуть спричинити швидке згоряння з утворенням ударної хвилі, причому це відбувається без детонації, як у звичайних вибухових речо-

вин у макромасштабі. Саме ця особливість уможливило використання нанобомби в живих організмах. Учені продемонстрували таку можливість в лабораторних умовах. В організм тварини вводили лікарський засіб. Потім на пухлинну тканину спрямовували невеликий пристрій, в якому відбувався вибух «нанобомб». Ударна хвиля від цих вибухів розповсюджувалася зі швидкістю 1 500–2 300 м/с, що втричі перевищує швидкість звуку. Завдяки ударній хвилі відбувається освітлення отворів у клітинах, в які швидко спрямовуються лікарські речовини. Цей процес займає дуже мало часу, всього декілька мілісекунд. У дослідках американських учених було продемонстровано дуже високу ефективність нового способу доставлення ліків за допомогою ударних хвиль — близько 99% ліків потрапило у клітини. Цікаво, що для здорових клітин, які також сприймають дію ударних хвиль, побічних ефектів за такою ударною обробкою значно менше порівняно з хіміотерапією. Розробники передбачають протягом 2–5 років завершити повний цикл випробувань і створити готовий медичний прилад. Окрім біомедичних застосувань, метод набуде застосування в геології та сейсмології.

Джерело: CNews.ru

Хронічний біль лікуватимуть генною терапією

Американські вчені запропонували використовувати генну терапію для боротьби із хронічним болем. Розроблена ними методика позбавлена несприятливих ефектів, характерних для опіатів, і справляє довготривалий знеболювальний вплив в експериментах на тваринах, повідомляє журнал Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS). На цей час для боротьби із хронічним болем, наприклад за умов раку, застосовують наркотичні анальгетики — аналоги морфіну. Для цих препаратів характерні такі побічні ефекти, як постійна сонливість, загальмованість мислення та галюцинації, що змушує деяких пацієнтів відмовлятися від їх приймання. Учені з Медичної школи Mount Sinai (Нью-Йорк) розробили методику, що імітує знеболювальний ефект опіатів, але має більш спрямовану дію. Вони використовували знешкоджений аденовірус як вектор-носіє гена, що запускає синтез ендорфінів (ендогенних опіатів) — речовин, що мають сильну

знеболювальну дію. Зазначені компоненти, уведені в спинномозкову рідину щурів, вибірково взаємодіяли з чутливими нейронами, блокуючи больові відчуття. За словами учених, після одного єдиного уколу щури, що страждали від хронічних болів, забували про них на цілих три місяці. «Спрямована генна терапія, ймовірно, дозволить уникнути негативних ефектів, характерних для опіоїдних знеболювальних засобів», — повідомив керівник дослідження Андреас Бойтлер (Andreas Beutler). Він відзначив, що в майбутньому ця методика може стати альтернативою існуючим методам боротьби із сильним хронічним болем, наприклад у пацієнтів на останніх стадіях раку.

Джерело: MedPortal.ru

Відторгненню органів навчилися запобігати без допомоги ліків

Дві незалежні команди американських учених заявили, що змогли позбавити пацієнтів, що перенесли трансплантацію нирки, від довічного приймання імунодепресантів. Звіт про ці випадки був опублікований у *New England Journal of Medicine*. В експериментах, проведених ученими з Массачусетської лікарні і Гарвардської медичної школи, брали участь п'ять осіб, що потребували пересадження нирки. Учені зруйнували частину кісткового мозку пацієнтів і за допомогою ліків знищили імунні клітини, що відіграють ключову роль у відторгненні чужорідного органа. Потім учасникам було пересаджено кістковий мозок і нирку, взяті від одного й того самого донора. Через 2–5 років після трансплантації четверо пацієнтів мають нормально функціонуючу нирку і не потребують приймання препаратів, що пригнічують імунітет. У свою чергу фахівці з Медичної школи Стенфордського університету під керівництвом Джона Скендлінга (John Scandling) досягли успіху у 47-річного Ларрі Ковальські (Larry Kowalski), якому було пересаджено нирку рідного брата. Органи чоловіків виявилися ідеально сумісними. Аби мінімізувати небезпеку відторгнення нирки, учені впливали на імунну систему пацієнта шляхом опромінювання і введення антитіл. Окрім того, йому перелили регуляторні Т-клітини з крові брата, що виконують роль «миропорців» імунної системи і перешкоджають

відторгненню чужорідного органа. Після трансплантації нирки Ковальські довелося деякий час приймати імуносупресивні препарати, проте через півроку їх вдалося повністю відмінити. Через 34 місяці після відміни ліків чоловік почувається чудово, їздить на велосипеді, займається сноубордом і дайвінгом, регулярно відвідує тренажерний зал і виховує трирічного сина. Довічне приймання імуносупресивних препаратів, якого потребують пацієнти після пересадження донорського органа, має безліч побічних ефектів. Ліки збільшують ризик інфекційних ускладнень, гіпертонії, спричиняють підвищення рівня холестеролу, а також сприяють розвитку деяких видів раку. Усунувши необхідність приймати імуносупресивні препарати, можна значно поліпшити якість життя пацієнтів, проте, як вважають учені, необхідні додаткові дослідження безпеки нових методик.

Джерело: MedPortal.ru

Розширено мережу біопаливних АЗС

Компанія «Енергетичні стратегії і біотехнологія» збільшила мережу біопаливних автозаправних станцій. Про це у прес-центрі «Українських новин» повідомив виконавчий директор компанії Михайло Лабутін. За його словами, усі нові автозаправки відкрито в Чернівецькій області. «На сьогодні ми відкрили 5 заправок у Чернівецькій області — вони продають тільки біопаливо БІО-100, працюємо вже декілька місяців», — сказав він. Лабутін уточнив, що біопаливо виробляється у Молдові. Водночас компанія має намір здійснювати у майбутньому виробництво біопалива на потужностях Державного концерну спиртової та лікєро-горілкової промисловості «Укрспирт».

«До податкової адміністрації вже подано документи для того, щоб була можливість виробляти дане паливо на держпідприємстві «Укрспирт»..., сподіватимемося, що нас почують і виробництво почнеться в Україні», — зазначив Лабутін. Компанія також не виключає будівництва в Чернівцях окремого заводу з виробництва біопалива. Терміни будівництва заводу, а також його орієнтовна вартість ще потребують уточнення. Як повідомляло агентство, раніше компанія «Енергетичні стратегії і біотехнологія» мала намір збільшити мережу біопаливних АЗС до червня цього року. Так, вже відкрито біопа-

ливному АЗС у Чернівцях. Товариство з обмеженою відповідальністю «Енергетичні стратегії і біотехнологія» є інвестором і оператором проекту розвитку в Україні мережі біопаливних АЗС.

Джерело:
<http://www.ukranews.com/rus/article/134265.html>

Харківська біотехнологія асептичного одержання, кріоконсервації, зберігання та використання сперми бугаїв-плідників

Запропонована біотехнологія включає спеціальну обробку бугаїв-плідників перед одержанням та взяттям сперми, її оцінку, розбавлення стерильним розріджувачем і розфасування в полімерні пакети, їх герметизацію, еквілібрацію сперми, заморожування, зберігання в рідкому азоті та штучне осіменіння тварин. Принциповою особливістю технології є те, що весь процес здійснюється за закритою схемою: сперма з моменту одержання її від бугая і до введення у цервікальний канал самиці не контактує із зовнішнім середовищем, забрудненим мікрофлорою. Асептичні умови взяття й оброблення сперми забезпечуються завдяки використанню комплексу апаратури та обладнання, до складу якого входять: манекен з гідропневматичною амортизацією для взяття сперми; штучна ванна спеціальної конструкції; пристрій для герметизації еякулятів; швидкодійні ваги; пристрій для асептичного розбавлення сперми; тонкостінна полімерна трубка; автомат для герметизації спермодоз у плівкову оболонку з маркувальною приставкою; пристрій для еквілібрації та заморожування сперми в рідкому азоті; інструменти для штучного осіменіння корів і телиць. Використання даної технології забезпечує автоматизацію трудомістких процесів на племінних підприємствах, дозволяє спростити оцінку сперми, її пакування та маркування. Кінцевий продукт видається у вигляді облицьованих гранул, що дає змогу виключити мікробний чинник під час штучного осіменіння великої рогатої худоби. Запропонована технологія кріоконсервації сперми має такі переваги перед аналогічними технологіями: на 80% знижується санітарний брак сперми у процесі її одержання, оброблення та використання; заплідненість тварин підвищується на 10–12%; у 8–10 разів зменшуються витрати рідкого азоту; на

50–60% зростає продуктивність праці обслуговуючого персоналу.

Джерело:
<http://www.minagro.gov.ua/page/?n=2245>

Нехірургічний спосіб трансплантації ембріонів свині

У Полтавському науково-дослідному інституті свинарства академіком А. В. Квасницьким було розроблено метод хірургічної трансплантації ембріонів свині і на початку 1950 р. одержано перших у світі поросят - трансплантатів. Роботи з трансплантації відновились у 1986 р. Хірургічний метод трансплантації значно удосконалили: на відміну від старого, він забезпечував успішне пересадження не лише 1–4-клітинних ембріонів у яйцепровід, але й бластоцист у матку. На підставі цих розробок було створено Полтавську технологію хірургічної трансплантації ембріонів свиней, що забезпечувала до 60% опоросів препубертатних реципієнтів масою 60–70 кг на день гормональної стимуляції, за середнього розміру гнізда 8 поросят і 57% виживаності ембріонів. Для порівняння наведено перші результати трансплантації 50-х років: 31% поросності та 35% виживаності ембріонів. Протягом 1991–1996 рр. розробляли принципово новий нехірургічний спосіб трансплантації. Та спочатку було значно вдосконалено метод вимивання ембріонів із матки свині хірургічним способом (оскільки нехірургічного для цього виду тварин поки що не існує). У результаті досягли 90–100% ефективності одержання 5–11-денних бластоцист як від інтактних, так і гормонально-стимульованих донорів. Розробка методу нехірургічної трансплантації ґрунтувалася на врахуванні фізіологічних особливостей репродуктивного тракту свині. Наприкінці 1996 р. безкровним способом отримали перших у СНД поросят-трансплантатів, генетичне походження яких визначали методом ампліфікації ДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. Подальше вдосконалення методу забезпечило підвищення рівня опоросів у реципієнтів у 1997 р. до 67%, а в поточному році порослими стало 80% реципієнтів.

Джерело:
<http://www.minagro.gov.ua/page/?2226>

Технологія одержання монозиготних близнят великої рогатої худоби з половинок ембріонів

У Бориспільському інституті розведення і генетики тварин (Київська обл.) було встановлено, що ефективність трансплантації ембріонів великої рогатої худоби значно підвищується з використанням методів мікрохірургічного розділення зародків. Суть розробки полягає в мікрохірургічному розділенні пізніх морул — раних бластоцист, одержаних нехірургічним шляхом із рогів матки генетично цінних корів — донорів ембріонів, на половинки, без використання мікроманіпулятора (вручну). Цей метод дає можливість одержувати цінних для генетичних і селекційних досліджень монозиготних близнят та практично без додаткових витрат збільшувати на 40–60% кількість телят від ембріонів донорів. Приживлюваність половинок практично не відрізнялась від такої цілого ембріона. У разі пересадження двох половинок зародків в один ріг матки кількість тільних тварин збільшувалась на 16%. Перевагою запропонованої розробки перед існуючими є те, що поділ ембріонів великої рогатої худоби здійснюється одним мікроінструментом без використання дорогого обладнання. Таким чином, цю технологію можна використовувати в будь-якому пункті з нехірургічної трансплантації. Мінімальна економічна ефективність використання технології одержання монозиготних близнят великої рогатої худоби становить 6 000 грн. на рік за умов отримання 1 200 телят на рік від половинок ембріонів. Виробничу перевірку запропонованого способу розділення пізніх морул — раних бластоцист проведено в Харківплемсервісі, Черкаському НВО «Прогрес», Прилуцькому племоб'єднанні. Було одержано телят — монозиготних близнюків, генетичну ідентичність яких підтверджено.

Джерело:

<http://www.minagro.gov.ua/page/?2214>

Технології виробництва нових кисломолочних продуктів

У Київському технологічному інституті молока та м'яса розроблено сучасні технології виробництва нових видів вітчизняних молочних продуктів, конкурентоспроможних на внутрішньому і європейському ринках. Вони призначені для всіх вікових груп населення як дієтичні продукти, що поліп-

шують загальний стан організму шляхом позитивного впливу на склад мікробної флори шлунково-кишкового тракту: «Біфівіт», «Біовіт» — лікувально-профілактичні харчові продукти для нормалізації функцій шлунково-кишкового тракту, які мають підвищену біологічну цінність та дієтичні властивості. Виробляють їх шляхом ферментації молочної основи різними видами бактеріальних препаратів чистих культур молочнокислих, оцтовокислих, пропіоновокислих бактерій і біфідобактерій: йогурти «Вершковий», «Здоров'я» з використанням відповідно підібраних чистих культур молочнокислих бактерій, що трансформують вершки, та додатково внесених у кінцевий продукт плодоовочевих наповнювачів. Вони мають високу поживну й біологічну цінність завдяки значному вмісту жиру, білка, лактози та інших компонентів. Для дитячого харчування розроблено сухий молочний продукт «Біолакт», призначений для вживання в разі штучного вигодовування немовлят, при захворюваннях шлунково-кишкового тракту, дисбактеріозах, що виникли в результаті лікування антибіотиками та внаслідок Чорнобильської катастрофи. «Біолакт» пройшов клінічні випробування в Київському НДІ педіатрії, акушерства і гінекології. Біфідобактерії, що входять до складу продукту, зупиняють розвиток гнійних і патогенних мікроорганізмів у кишечнику, підвищують засвоюваність білків, беруть участь у синтезі вітамінів, активізують імунну систему організму. Роботу виконано як внесок у розвиток Національної програми «Діти України». Розроблені технології мають комплекти нормативно-технологічної документації, апробовані та використовуються на Дослідному виробництві бактеріальних заквасок ТІММ.

Джерело:

<http://www.minagro.gov.ua/page/?2215>

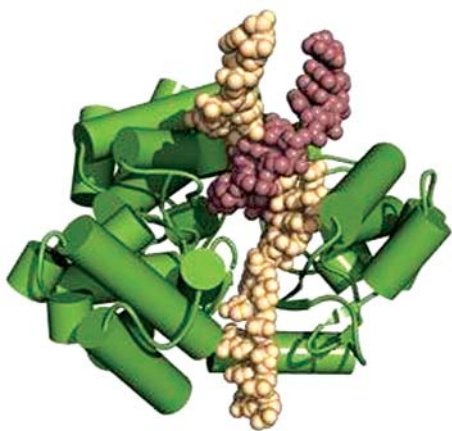
Розкрито структуру «ензиму старіння»

Нарешті розшифровано структуру ділянки ензиму теломерази, відповідального за механізм координації процесу старіння клітин у часі. Вивчення кристалічної структури ензиму дозволяє глибше зрозуміти суть процесу старіння здорових клітин, а також розробляти безпечніші методи терапії (до 90% онкологічних захворювань людини). Теломераза підтримує довжину теломер, кінцевих ділянок хромосом, додаючи до них послідовності ДНК, що повторюють-

ся, і таким чином запобігаючи ушкодженню хромосом у ході поділу клітин, оскільки в кожному циклі поділу відбувається укорочення клітинної ДНК. Ензим активно продукується в ембріональних стовбурових клітинах, дозволяючи їм активно ділитися без руйнування хромосом, однак під час диференціювання клітин кількість активної ДНК в них знижується, і теломераза перестає експресуватися. Це вважають основним механізмом, що визначає час життя клітини та число поділів, які вона може пройти. Проте в багатьох пухлинах відбувається повторна активація ензиму, що дозволяє злякисним клітинам нескінченно ділитися. З моменту відкриття теломерази в 1985 р. Елізабет Блекберн (Elizabeth Blackburn) і її колегою Керол Грейдер (Carol Greider) з Каліфорнійського університету в Берклі (University of California, Berkeley) цей ензим вважають важливою мішенню протиракової терапії. Однак усі роботи в цій галузі гальмувалися через складність структури теломерази, що складається з білкової частини і молекули РНК. Утім, нещодавно наукова група, очолювана Еммануелем Скордалакесом (Emmanuel Skordalakes) з Wistar Institute in Philadelphia (США, штат Пенсільванія), отримала стабільну форму ензиму теломерази після скринінгу генів цього ензиму у декількох десятків видів тварин. Учені виявили, що ген теломерази жука *Tribolium castaneum* набагато коротший, ніж ген інших видів. Це певною мірою спростило їхню роботу і дозволило клонувати ген у бактеріях і отримати його в достатній кількості, щоб використовувати в експериментах з кристалграфії. Результати їх було опубліковано в журналі Nature.

Дослідження Скордалакеса стосувалося в основному білкової субодиниці теломерази, яка називається TERT і організована в кільцеподібну структуру, що за формою

нагадує ензим зворотну транскриптазу ретровірусів, таких як ВІЛ. Ця схожість, як вважає керівник роботи, не випадкова. Вона свідчить про спільність походження цих ензимів і має прискорити роботи з адаптації анти-ВІЛ препаратів для блокування теломерази у злякисних клітинах. «Противірусний препарат AZT недавно з вельми скромним успіхом застосовувався в терапії раку, — говорить Скордалакес, — проте тепер нам відома тривимірна структура активного сайту ензиму, і ми можемо з'ясувати, чому ці інгібітори так погано працюють. Ми можемо модифікувати їх так, щоб вони краще зв'язувалися з активним сайтом». Теломераза залишається активною в деяких швидко проліферуючих дорослих клітинах, таких як клітини волоссяних фолікулів або яєчок. Але її розподіл у ракових і здорових клітинах відрізняється значно більше, ніж розподіл інших ензимів — кіназ, які є мішенями багатьох протиракових препаратів. У майбутньому це дозволить одержувати високоспецифічні препарати, не токсичні для нормальних клітин. «Це ключовий момент у розумінні того, яким чином працює теломераза. Фундаментальні дослідження, такі як це, допоможуть ученим розробляти ліки, що блокують теломеразу і можуть бути використані в терапії широкого спектру онкологічних захворювань», — зазначила Ліз Бейкер (Liz Baker), провідний прес-секретар дослідницького добродійного Фонду досліджень раку (Велика Британія). Проте розшифрування домена TERT, на думку Елізабет Блекберн, не є остаточним рішенням. TERT у ензимі взаємодіє з РНК, необхідною для зв'язування з ДНК (рисунок) і цей процес досі залишається не з'ясованим. «Отже рішення найважливішої задачі все ще залишається справою майбутнього: необхідно з'ясувати, яким чином взаємодіють у теломеразі РНК і білок», — наголосив Блекберн.

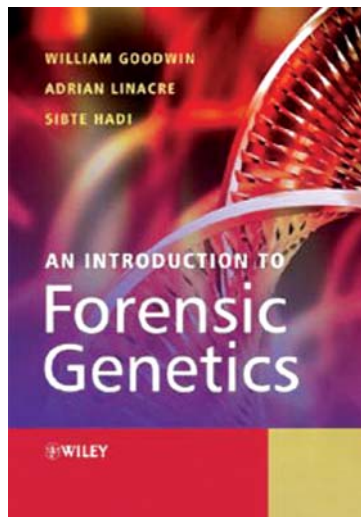


Взаємодія білкового компонента ензиму з РНК та ДНК

Джерело:
<http://www.cbio.ru/modules/news/article.php?storyid=3269>

Матеріал підготував
 д. б. н. Є. Л. Левицький

НОВІ ПУБЛІКАЦІЇ З БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА СУМІЖНИХ ДИСЦИПЛІН



AN INTRODUCTION TO FORENSIC GENETICS

Вступ до судово-медичної генетики

*William Goodwin
Adrian Linacre
Sibte Hadi*

Вичерпний посібник для тих, хто розпочинає вивчення цієї галузі науки, що бурхливо розвивається, починаючи від спірних юридичних питань до таких, що не викликають заперечень. В останні декілька років у галузі молекулярної генетики було досягнуто беззаперечних успіхів, які революціонізували судову медицину. У книзі подано ключові концепції, необхідні для повної оцінки даного предмета, а також розглянуто останні досягнення в цій галузі із залученням робіт з вивчення матеріалів відповідних судових справ. Окрім технології одержання профілю ДНК наведено також

дані, що лежать в основі біології популяцій і статистичної інтерпретації отриманих даних. Обговорюються процедури оцінки і подання матеріалів стосовно ДНК у суді, а також процедура нагляду за оцінкою процесу і судових звітів.

Обсяг: 162 стор.

Видавництво: Wiley (USA).

Дата публікації: 2007 р.

Мова: англ.



БИОМАТЕРИАЛЫ, ИСКУССТВЕННЫЕ ОРГАНЫ И ИНЖИНИРИНГ ТКАНЕЙ

Біоматеріали, штучні органи та інжиніринг тканин

*Л. Хенч
Д. Джонс*

Книга містить інформацію про розробки, що проводяться на стику багатьох наукових дисциплін, спрямованих на створення спеціалізованих біоматеріалів, пристроїв, штучних органів, вирощування людських клітин *in vitro* як конструктивів тканини.

Обсяг: 304 стор.

Видавництво: Техносфера (РФ).

Дата публікації: 2007 р.

Мова: рос.



**«ОПАСНОЕ ЗНАНИЕ» В «ОБЩЕСТВЕ РИСКА»
(ВЕК ГЕНЕТИКИ И БИОТЕХНОЛОГИИ)**

**«Небезпечне знання» в «суспільстві ризику»
(доба генетики і біотехнології)**

В. Ф. Чешко

Монографію присвячено філософським і природничо-науковим аспектам перетворення сучасної фундаментальної науки й високих технологій на чинник соціального ризику.

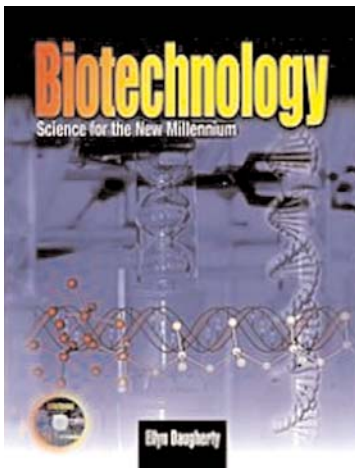
З розвитком науки і технології людина постійно «витісняє» ризики і небезпеки власному існуванню та благополуччю за межі контрольованої суспільством частини природи. Проте в епоху так званих високих технологій можливості компенсувати наслідки природничо-перетворювальної діяльності, підтримувати свої основні параметри у межах, придатних для гідного існування самої людини, виявилися майже вичерпаними.

Обсяг: 544 стор.

Видавництво: ИД «ИНЖЭК» (РФ).

Дата публікації: 2007 р.

Мова: рос.



**BIOTECHNOLOGY:
SCIENCE FOR THE NEW MILLENNIUM**

Біотехнологія: наука нового тисячоліття

Ellyn Daugherty

Монографія охоплює основні концепції та процеси біотехнології, такі як біотехнологічні дослідження та виробництво фармацевтичних препаратів, продуктів промисловості, сільського господарства, а також забезпечення відповідною базою приладів. Подано ґрунтовне обговорення геноміки, біоінформатики, мікроректорів, а також протеоміки. Наведено вражаючу інформацію стосовно успіхів біотехнології у розробленні лікарських засобів, у тому числі рослинного походження, генній терапії, судовій медицині та садівництві. Висвітлюються спірні питання, що стосуються біоетики, останніх наукових та апаратних досягнень біотехнології.

Вміщено також дані про бізнесову сферу біотехнології, включаючи можливості та успіхи як академічної, так і промислової біотехнологій, та пов'язані з ними юридичні питання.

Обсяг: 420 стор.

Видавництво: Paradigm Publishers (USA).

Дата публікації: 2007 р.

Мова: англ.



ТОЛКОВЫЙ СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ ПО ОБЩЕЙ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ, ОБЩЕЙ И ПРИКЛАДНОЙ ГЕНЕТИКЕ, СЕЛЕКЦИИ, ДНК-ТЕХНОЛОГИИ И БИОИНФОРМАТИКЕ (в двух томах)

Тлумачний словник термінів із загальної та молекулярної біології, загальної та прикладної генетики, селекції, ДНК-технології та біоінформатики (у двох томах)

В. И. Глазко

Г. В. Глазко

Словник містить терміни із загальної біології, цитології, генетики, біохімії, молекулярної біології, біотехнології та екології. Подано також принципово нову термінологію, що дає розуміння сутності двох сучасних дисциплін, які швидко розвиваються, — ДНК-технології та біоінформатики. Особливість словника полягає в тому, що для кожного російського терміна наведено англійський еквівалент. Зроблено необхідні застереження або роз'яснення у разі, якщо термін має різні значення або різні терміни визначають близькі поняття, що робить використання словника зручнішим. Це довідкове видання призначено як для біологів, медиків, так і для широкого кола фахівців суміжних наук, перекладачів, викладачів та студентів вищих навчальних закладів.

Обсяг: 1208 стор.

Видавництво: Академкнига – Медкнига (РФ).

Дата публікації: 2008 р.

Мова: рос.



КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ

Клітинна терапія

А. А. Новик

Р. А. Иванов

Книгу присвячено медико-біологічним і клінічним аспектам нового й надзвичайно перспективного методу лікування — клітинної терапії. Подано аналіз результатів клінічних досліджень безпеки й ефективності застосування методів клітинної терапії в різних галузях медицини. Автори докладно висвітлюють оригінальну концепцію високодозової терапії з аутологічною трансплантацією кровотворних стовбурових клітин при аутоімунних захворюваннях. Наведено етичні, юридичні й організаційні аспекти застосування препаратів стовбурових клітин. Особливо наголошується на необхідності контрольованого та науково обґрунтованого застосування клітинних препаратів у клінічній практиці. Для клініцистів різних спеціальностей, біологів, фахівців регуляторних органів.

Обсяг: 240 стор.

Видавництво: Медицинское информационное агентство (РФ).

Дата публікації: 2008 р.

Мова: рос.

ГЕНОМ ЧЕЛОВЕКА**Геном людини***Э. МакКонки*

У монографії наведено новітні відомості про структуру і функцію генів, про те, як мутації призводять до розвитку спадкових хвороб та як прогрес у нашому розумінні проблеми генома людини впливає на практичну медицину. Буде корисною кожному, хто хоче розширити свої знання в галузі медичної генетики та біотехнології людини. Це ідеальний посібник для студентів і викладачів природничо-наукових, гуманітарних та медичних вузів і факультетів, медичних працівників і практикуючих лікарів — усіх, хто хоче оволодіти знаннями про молекулярно-генетичні основи хвороб. Аби зробити книгу доступною якомога ширшому колу читачів, перекладач доповнив її численними коментарями, списком літератури і посиланнями на ресурси Інтернету.

Обсяг: 288 стор.**Видавництво: Техносфера (РФ).****Дата публікації: 2008 р.****Мова: рос.****ВВЕДЕНИЕ В НАНОТЕХНОЛОГИЮ (2-е издание)****Вступ до нанотехнології (2-ге видання)***Н. Кобаяси*

Посібник у популярній формі знайомить читача з досягненнями в галузі нанотехнології в Японії та інших країнах наприкінці ХХ — на початку ХХІ століття. Продемонстровано справді фантастичні можливості нанотехнології в таких галузях, як електроніка, енергетика, біологія, медицина тощо. Велику увагу приділено економічним і соціальним наслідкам впровадження нанотехнології в життя суспільства. Для студентів, які вивчають дисципліни, пов'язані із застосуванням нанотехнології, а також для науковців та викладачів відповідних спеціальностей.

Обсяг: 136 стор.**Видавництво: Медкнига (РФ).****Дата публікації: 2008 р.****Мова: рос.**



НАНОТЕХНОЛОГИИ. НАУКА, ИННОВАЦИИ И ВОЗМОЖНОСТИ (пер. с англ.)

Нанотехнології. Наука, інновації та можливості (перекл. з англ.)

За ред. Л. Фостер

Автори книги — відомі вчені та бізнесмени, які працюють над вирішенням теоретичних і практичних проблем нанотехнологій, описують стан справ і перспективи розвитку їх на найближче десятиріччя, а також досліджують можливий вплив нанотехнологій на глобальні процеси. Призначена для широкого кола читачів: науковців, фахівців, а також студентів профільних навчальних закладів.

Обсяг: 350 стор.

Видавництво: Техносфера (РФ).

Дата публікації: 2008 р.

Мова: рос.



МНОГОМЕРНЫЙ ЧЕЛОВЕК. НОВЫЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ АЛГОРИТМ САМОИСЦЕЛЕНИЯ ЧЕЛОВЕКА И ЛЕЧЕНИЯ ЖИВОТНЫХ

Багатовимірна людина. Новий вискоефективний алгоритм самозцілення людини та лікування тварин

Л. Г. Пучко

Монографію присвячено принципово новим методам зцілення від так званих невиліковних і важковиліковних, хронічних захворювань, які можуть переслідувати людину практично все життя. Автор — академік Російської і Міжнародної інженерних академії — добре знайома читачам за трьома попередніми монографіями, що вийшли у видавництві АНС під рубрикою «Відкриття майбутнього». У 2006 р. за розробку нових підходів до (само)діагностики і (само)зцілення людини, основи яких викладено у книгах «Біолокація для всіх», «Багато-

вимірна медицина» і «Радієстезичне пізнання людини», Л. Г. Пучко було нагороджено Міжнародною премією із врученням диплома «Лідер економічного розвитку Росії». Вискоефективні алгоритми (само)діагностики і (само)зцілення людини базуються на гіпотезі, що існує з давніх часів, про те, що разом із фізичним тілом усі живі істоти мають і «тонкоматеріальні» тіла. Таким чином, будь-який живий організм автор вважає «багатовимірним». Висловлюється припущення, що цим тілам притаманне випромінювання в надвисокочастотних діапазонах. На жаль, зараз нема технічної апаратури, здатної проводити вимірювання на цих частотах, тому представники сучасної наукової медицини заперечують їх наявність. Утім, добре відомо, що, не усунувши причину захворювання, можна тільки поліпшити стан хворого, але повністю вилікувати його неможливо. Тому й існують сьогодні численні хронічні й так звані невиліковні захворювання (рак, цукровий діабет, шизофренія, деякі серцево-судинні захворювання тощо). Л. Г. Пучко припускає, що саме в «тонких» тілах людини і містяться ті глибинні причини захворювань, без усунення яких неможливе зцілення. Для усунення їх потрібні: по-перше, системний підхід до організму людини і, по-друге, нова біотехнологія боротьби з цими глибинними причинами. Такою біотехнологією, що дозволяє ліквідувати першопричини практично будь-яких захворювань, виступають ефективніші системні алгоритми, а також вібраційні ряди з новими принциповими установками. Наведені у четвертій монографії Л. Г. Пучко нові підходи до зцілення людини і лікування тварин, можуть дозволити збільшити тривалість життя людини, поліпшивши її якість. Книга призначена для тих, хто цікавиться альтернативною медициною, а також для всіх, хто хоче бути здоровим і щасливим.

Обсяг: 480 стор.

Видавництво: АСТ/Астрель (РФ).

Дата публікації: 2008 р.

Мова: рос.



СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ: УЧЕБНИК ДЛЯ ВУЗОВ.

Под ред. В. С. Шевелухи
(3-е издание, переработанное и дополненное)

Сільськогосподарська біотехнологія: підручник для вузів.

За ред. В. С. Шевелухи (3-тє видання, перероблене й доповнене)

*В. С. Шевелуха
Е. А. Калашникова
Е. З. Кочиева и др.*

Третє видання зберігає тенденції двох попередніх і містить у концентрованому вигляді ідеї й досягнення біотехнології та біоінженерії як найважливіших пріоритетів фундаментальної науки і високих технологій ХХІ століття. Найбільшої переробки у третьому виданні зазнали розділи «Біотехнологія і біобезпека», «Біотехнологія у тваринництві», «Застосування досягнень біотехнології і біоінженерії в агропромисловому виробництві», що зумовлено прискореним розвитком наукових досліджень у галузях біотехнології і біоінженерії, дедалі зростаючою стурбованістю громадськості розширенням масштабів виробництва і споживання трансгенних продуктів та украй слабкою інформованістю людей стосовно безпеки їх використання. Підручник доповнено розділом «Біотехнологія в екології». Істотні доповнення внесено також і в решту розділів книги.

Обсяг: 710 стор.

Видавництво: Высшая школа (РФ).

Дата публікації: 2008 р.

Мова: рос.



ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Ферментативні процеси в біотехнології

*А. М. Безбородов
Н. А. Загустина
В. О. Попов*

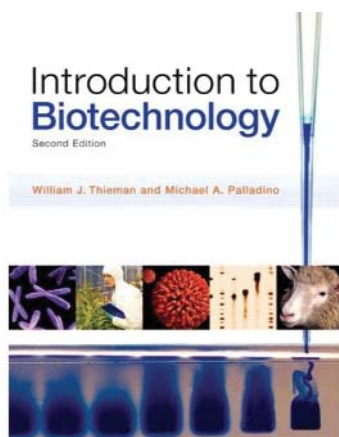
Монографія складається із трьох розділів: мікробіологічний синтез; екстремальні форми мікроорганізмів у біотехнології; ферментативні реакції у біотехнології. Викладено основні принципи процесів регуляції метаболізму у мікроорганізмів, зокрема у процесах мікробіологічного синтезу під час ферментації. Подано матеріал про одержання нетрадиційних продуктів ферментації, описано процеси мікробіологічного синтезу екстремальними формами мікроорганізмів (термоотрутами, психрофілами, галофілами, алкалофілами), а також отримання метаболітів за допомогою ферментів, виділених з екстремальних форм. У третій частині вміщено необхідні для біотехнологів відомості про метаболічну інженерію і способи стабілізації ферментів. Наведено опис реакцій органічного синтезу в органічних розчинниках, що каталізують ферментами, а також численні приклади таких реакцій. Завершує монографію розділ, в якому подано матеріал про сучасний стан промислового біокаталізу. Для фахівців, які працюють у галузі біотехнології, студентів, аспірантів і викладачів вузів біотехнологічного профілю.

Обсяг: 336 стор.

Видавництво: Наука (РФ).

Дата публікації: 2008 р.

Мова: рос.



INTRODUCTION TO BIOTECHNOLOGY (2-nd edition)

Вступ до біотехнології (2-ге видання)

*William J. Thieman
Michael A. Palladino*

Вичерпний посібник, що містить практичну інформацію про останні досягнення біотехнологічної галузі та забезпечує читача основними фундаментальними і прикладними знаннями, необхідними для її успішного засвоєння та розвитку продуктивних сил. Складається з таких розділів: доба біотехнології та розвиток її продуктивних сил; вступ до науки про гени та геноми; історія генетичної інженерії: технологія рекомбінантних ДНК, білків як біотехнологічних продуктів; мікробіологічна біотехнологія; сільськогосподарська біотехнологія; біотехнологія тварин; аналіз ДНК-фінгерпринтів у судовій медицині; біокорекція; біотехнологія води; медична біотехнологія; юридична біотехнологія та біоетика.

Обсяг: 408 стор.

Видавництво: Benjamin Cummings (USA).

Дата публікації: 2008 р.

Мова: англ.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ ЧЕЛОВЕКА: ВЫЗОВЫ, ПРОБЛЕМЫ, РИСКИ

Генетична інженерія людини: виклики, проблеми, ризики

Е. Н. Гнатик



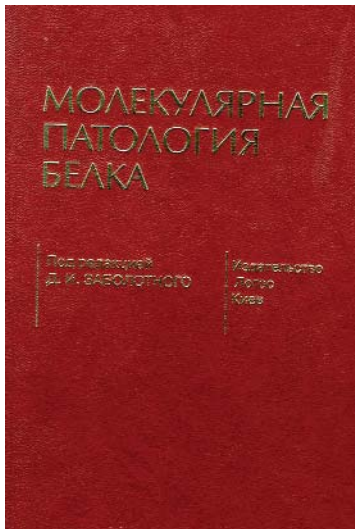
Виникнення і вдосконалення генетичної інженерії відкриває перспективи якісних змін життя людини. Наслідки впровадження методів цієї науки можуть виявитися набагато вагомішими, аніж результати всіх колишніх наукових і технологічних проривів разом узятих. Монографію присвячено обговоренню філософських, соціальних, етичних, правових та інших питань, що виникають у зв'язку з розвитком генетики людини. Призначена для викладачів, аспірантів і студентів природничо-наукових та гуманітарних напрямів, а також для широкого кола читачів, що цікавляться сучасними досягненнями і проблемами генетики людини.

Обсяг: 240 стор.

Видавництво: Техносфера (РФ).

Дата публікації: 2009 р.

Мова: рос.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ПАТОЛОГИЯ БЕЛКА*Под ред. Д. И. Заболотного***Молекулярна патологія білка***За ред. Д. І. Заболотного*

Залежність біологічної активності від конформаційного стану є найважливішою властивістю білкових молекул. Зважаючи на очевидне практичне значення, молекулярні механізми формування і підтримки білкової структури, шляхи і функціональні наслідки її порушення привертають неослабний інтерес дослідників з найрізноманітніших галузей біохімії, біофізики, медицини і біотехнології. Водночас саме широта і різноманітність питань, що стають дедалі актуальнішими, ускладнюють вивчення цієї найважливішої сфери функціональної біохімії. Тому можна вітати вихід у світ книги, що написана групою провідних фахівців НАН України, АМН

України і Російської академії наук, яка містить вичерпний виклад сучасних уявлень про механізми формування білкової структури, шляхи і патофізіологічні наслідки її порушення, і є спробою узагальнення основних законів протеоміки. На підставі аналізу великого експериментального матеріалу обґрунтовується положення про узгодженість дії структуротвірних, підтримувальних та елімінуючих систем процесингу білків, пропонується пояснення шляхів забезпечення подібного узгодження, розглядаються наслідки його порушення. Зокрема, наведено великий за обсягом матеріал стосовно етіологічних аспектів групи донедавна рідкісних патологій, що набули в останні десятиліття великого поширення серед населення розвинених країн. Особливу увагу приділено шляхам формування аутоімунних процесів та їхньому клінічному значенню. Поряд із питаннями фундаментальної біохімії і медицини розглядаються питання біотехнології білкових препаратів. Подано глибокий аналіз відомих способів їх збереження в активному стані, шляхів утворення імуногенних домішок, методичних підходів до запобігання формуванню останніх. З тієї ж точки зору розглядається надзвичайно актуальне для вдосконалення технологій імплантацій питання денатурації білків в умовах контакту з чужорідним матеріалом. За широтою охоплення і комплексним характером висвітлення проблем ця монографія унікальна і не має аналогів ні в нашій країні, ні за кордоном. У поточному році очікується вихід її англomовного варіанта у США. Пропоноване видання становить безперечний інтерес для фахівців різноманітних галузей біохімії, біотехнології і медицини, які цікавляться законами функціонування живого.

Обсяг: 236 стор.**Видавництво: Логос (Україна).****Дата публікації: 2008 р.****Мова: рос.**

КОНФЕРЕНЦІЇ, З'ЇЗДИ, СИМПОЗИУМИ, ВИСТАВКИ

ВЕЛЬМИШАНОВНІ КОЛЕГИ!

Українське біохімічне товариство інформує, що 3–7 жовтня 2009 року в Ялті відбудеться чергова міжнародна VII Парнасівська конференція, яку буде присвячено нагальним проблемам сучасної біохімії та молекулярної біології. Організаторами Конференції є Українське біохімічне товариство та Польське біохімічне товариство.

Планується, що під час роботи Конференції працюватимуть наукові секції за такою тематикою:

- роль рецепторів та ефекторів у клітинній сигналізації;
- біологія позаклітинного матриксу;
- технології роботи з нуклеїновими кислотами;
- молекулярна медицина;
- досягнення у галузі біотехнології та біобезпеки.

Термін подання тез доповідей — 30 квітня 2009 року.

Грунтовну інформацію щодо Конференції Ви зможете одержати, звернувшись до її електронного сайту за адресою: <http://www.parnas-7.info/>

Сподіваємося, що творча зустріч колег-біохіміків, фахівців у галузі молекулярної біології та суміжних дисциплін у мальовничому куточку Криму восени 2009 року сприятиме плідним науковим дискусіям та встановленню нових творчих контактів!

Організатори Конференції запрошують взяти активну участь у її роботі наукову молодь — аспірантів, пошукувачів, студентів старших курсів.

Українське біохімічне товариство
<http://www.biochemistry.org.ua/index.php?content=about-ubt&lang=ua>
к.б.н. Г. В. Данилович, референт Товариства,
т. 8-(044)-234-10-53,
e-mail: danylovych@biochem.kiev.ua

VII PARNAS CONFERENCE on Biochemistry and Molecular Biology Yalta, Crimea, Ukraine, October 3–7, 2009

Dear Colleagues!

On behalf of the Ukrainian and Polish Biochemical Societies it is my honour and pleasure to announce that the 7th Parnas Conference on Biochemistry and Molecular Biology is going to be held in Yalta, Ukraine on October 3–7, 2009. We would like to invite you to attend this biannual International conference named after the famous biochemist Professor Yacub Parnas.



The main goal of the conference is to enhance collaboration between European scientists particularly young ones and to stimulate open and direct discussions on recent breakthroughs and advances in Molecular Biology, Biochemistry and Biotechnology. As usual the scientific program will be a selection of plenary lectures, oral presentations and poster sessions.

The Parnas Conference traditionally supports participation of talented young scientists. This is recognized by decreasing in registration fee for participants under 35 and awards for winning young scientists.

The Conference venue with 275 persons conference hall is situated on the west coast of Yalta Bay, in the gorgeous evergreen park — a monument of the landscape art Chukurlar within walking distance to the center of Yalta as

well as to Livadia Imperial Palace where Yalta Conference was held in 1945 among «Big Three». We hope that the setting of the Parnas Conference at the Crimea seacoast encourages the exchange of creative ideas and provides a great atmosphere for social events.

We are looking forward to seeing you soon in Yalta on the occasion of the 7th Parnas Conference.
On behalf of the Organizing Committee,

Serhiy Komisarenko.

**SCIENTIFIC PROGRAM INCLUDES PLENARY LECTURES,
SESSION LECTURES, ORAL PRESENTATIONS
AND POSTER SESSIONS**

SESSIONS:

I. Receptors and Effectors in Cell Signaling [coordinators: Jolanta Baranska (Poland), Lyudmila Drobot (Ukraine)].

II. Biology of Extracellular Matrix [coordinators: Leszek Kaczmarek (Poland), Rostislav Stoika (Ukraine)].

III. Nucleic Acid Technologies (RNA silencing, microRNA, antisense NA, etc) [coordinators: Hanna El'ska (Ukraine), Jan Barciszewski (Poland)].

IV. Molecular Medicine [coordinators: Piotr Laidler (Poland), Oleksandr Reznikov (Ukraine)].

V. Advances in Biotechnology and Biosafety, Biosecurity [coordinators: Serhiy Komisarenko (Ukraine), Stanislaw Bielecki (Poland)].

STRUCTURE OF THE CONFERENCE:

October 3th, Saturday evening: Opening ceremony + two Plenary lectures (2 x 40 min.).

October 4th, Sunday morning:

08:00–10:00 — poster Sessions I+II,
10:00 — Session I

October 4th, Sunday after lunch:

15:00 — Session II

October 5th, Monday morning:

08:00–10:00 — poster Sessions III and 10:00 — Session III

October 5th, Monday after lunch: Social programme and dinner in the evening

October 6th, Tuesday morning:

08:00–10:00 — poster Sessions IV and V,
10:00 — Session IV

October 6th, Tuesday after lunch:

15:00 — Session V

October 7th, Wednesday morning:

09:00–11:30 — oral presentations, poster Sessions general discussion, presentation of awards for winning young scientists and closing ceremony.

Total: two Plenary lectures (2×40 min. each), 10 Session lectures — 30 min*. each (2 lectures at each of 5 Sessions), ~ 30 Session oral reports — 20 min*. each (6 reports at each of 5 sessions) and 10 young scientists oral poster presentations — 10 min*. each (2 oral presentations at each of 5 sessions).

*Indicated time includes a discussion and questions.



PARNAS BIOCHEMICAL CONFERENCES

In September 9, 1996, the 1st Parnas Biochemical Conference started its work in Lviv (Ukraine).

Who was Jakub Oskar Parnas?

Professor Jakub Parnas was an outstanding biochemist in the field of enzymology of carbohydrate metabolism (Embden-Meyerhof-Parnas pathway) and energy generation at that metabolism. In Poland, he is considered to be a father of Polish biochemistry.

Why the 1st Parnas conference was organized in Lviv?

Since Prof. Jakub Parnas was born in Western Ukraine and worked for a long time (1920–1941) in Lviv, well known as a big cultural and scientific center of Ukraine, it is reasonable to consider him as one of the founders of the Ukrainian biochemistry, too. Before the 2nd world war, Lviv was a very multinational city, and there were many Ukrainians among Parnas's students at Lviv University, as well as among the co-workers of his research laboratory.

Brief History of Parnas conferences

1996 (Lviv, Ukraine) — The co-organizers of the 1st Parnas conference were: Prof. Rostyslav Stoika (from the Ukrainian side) and Prof. Liliana Konarska, President of Polish Biochemical Society (from the Polish side). That conference was the first official commemoration of Prof. Jakub Parnas who died in KGB prison in Moscow in January 1949 though before the imprisonment he was elected to the USSR Academies of Sciences and of Medical Sciences and was awarded with the most prestigious Soviet awards. At the closing ceremony of the conference, Prof. R. Stoika suggested the Parnas conferences to become organized regularly, once in two years alternatively in Ukraine and Poland. That idea was accepted, and it successfully works till now.

1998 (Gdansk, Poland) — The co-organizers of the 2nd Parnas conference were: Prof. Stefan Angielski (Poland) and Prof. Rostyslav Stoika (Ukraine). That conference coincided in time with the days of Ukrainian culture in Poland that were organized in Gdansk. It showed to be really international, rather than bilateral scientific conference, since many outstanding scientists from many countries of the world participated in that conference.

2000 (Lviv, Ukraine) — The co-organizers of the 3rd Parnas conference were: Prof. Rostyslav Stoika (Ukraine) and Prof. Jolanta Baranska, President of Polish Biochemical Society. The international traditions of Parnas conferences were successfully continued at Parnas conference in Lviv.

2002 (Wroclaw, Poland) — The co-organizers of the 4th Parnas conference were: Prof. Jolanta Baranska, President of the Polish Biochemical Society and Prof. Serhyi Komisarenko, President of the Ukrainian Biochemical Society.

2005 (Kyiv, Ukraine) — The co-organizers of the 5th Parnas conference were: Prof. Serhyi Komisarenko, President of the Ukrainian Biochemical Society (Ukraine) and Prof. Jolanta Baranska, President of the Polish Biochemical Society (Poland).

2007 (Cracow, Poland) — The co-organizers of the 6th Parnas conference were: Prof. Jolanta Baranska, President of the Polish Biochemical Society and Prof. Serhyi Komisarenko, President of the Ukrainian Biochemical Society.

2009 (Crimea, Ukraine) — The co-organizers of the 7th Parnas conference are: Prof. Serhyi Komisarenko, President of the Ukrainian Biochemical Society and Prof. Andzej Dzugaj, President of the Polish Biochemical Society.

Parnas Biochemical Conferences showed to be not only an excellent opportunity to start new scientific collaborative projects between the Ukrainian and Polish biochemists, but also gain friends among. These conferences also provide good chances for involving Ukrainian biochemists into the international scientific collaboration, since the level of these conferences is increasing constantly. It should be stressed that scientific ideas of Prof. Jakub Parnas have been developed at Parnas conferences according to achievements and tendency in modern Biochemistry, since all conferences are focused at specific ideas of Cell Biochemistry, namely cell signaling, communication, apoptosis, etc.